



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA A STABILITA PIVA S PŘÍDAVKEM
PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ**

PREPARATION AND STABILITY OF BEER ENRICHED BY PROBIOTICS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michal Kočnar

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1274/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Michal Kočnar**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Příprava a stabilita piva s přidavkem probiotických bakterií

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je příprava a analýza piva s obsahem probiotických bakterií včetně testování přidavku probiotik v různých fázích výroby piva.

V rámci práce budou řešeny následující díčí úkoly:

- literární rešerše zaměřená na biologické účinky probiotik a technologii výroby piva
- kultivace vybraných typů probiotických bakterií v modelových a reálných vzorcích piva
- optimalizace metod stanovení počtu a viability probiotických bakterií
- sledování míry přežití probiotických bakterií v průběhu procesu vaření piva
- návrh optimální technologie přípravy piva obohaceného probiotiky.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michal Kočnar
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá přípravou a sledováním biologické stability piva obohaceného probiotiky. V práci byly použity kmeny probiotických bakterií *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium bifidum*.

Teoretická část je rozdělena do dvou sekcí. V první sekci jsou obecně charakterizována probiotika, jejich role v rámci střevní mikrobioty a mikrobiologie konkrétních probiotických mikroorganismů se zaměřením na bakteriální rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Dále jsou zmíněny některé faktory ovlivňující viabilitu a růst probiotik. V této části jsou také popsány biologické účinky probiotik na lidský organismus a jejich potenciální klinické aplikace. Druhá sekce teoretické části se věnuje technologii přípravy piva, jeho chemickému složení a jednotlivým pivním stylům.

V experimentální části byla nejprve provedena optimalizace metod stanovení koncentrace a viability buněk probiotických bakterií. Pro stanovení těchto parametrů bylo vybráno několik technik, konkrétně metoda kultivační, metoda průtokové cytometrie a metoda spektrofotometrického měření zákalu. Následně byly spektrofotometricky naměřeny růstové křivky použitých kmenů probiotik v MRS médiu. Probiotické bakterie byly kultivovány v modelových vzorcích piva, tj. v MRS médiích s několika různými koncentracemi ethanolu. Lze konstatovat, že ethanol neměl podstatný vliv na růst probiotik.

Následně byly provedeny experimentální kultivace jednotlivých probiotických bakterií i jejich směsí v devíti reálných vzorcích piva. Ve sledovaných vzorcích nedocházelo u žádného kmene k nárůstu koncentrace viabilních buněk. Naopak bylo zaznamenáno snížení koncentrací, přičemž větší pokles nastal u samostatných kmenů a menší pokles u směsí. Určité hodnoty koncentrací živých buněk však byly po uplynulé době kultivace stanoveny ve všech případech.

Bylo připraveno světlé, svrchně kvašené pivo s přídavkem probiotik, u kterého byla sledována koncentrace viabilních buněk probiotických bakterií v průběhu 37 dní kvašení. Téměř u všech vzorků došlo ve výsledku k poklesu koncentrace o dva řády CFU/ml. Živé buňky probiotických bakterií byly ovšem na konci kvašení zjištěny u všech vzorků připraveného piva. Nejvyšší dosažená koncentrace viabilních buněk probiotik v připraveném pivu, stanovená kultivační metodou, byla rovna $(3,80 \pm 0,14) \cdot 10^5$ CFU/ml. Ve vybraných vzorcích byly na základě HPLC-RI analýzy kvantifikovány pro pivo běžné koncentrace ethanolu, kyselina mléčná nebyla detekována. U vybraných vzorků byla také provedena senzorická analýza.

Na základě výsledků experimentální části a s využitím literatury je v práci diskutována optimální technologie přípravy piva obohaceného probiotiky.

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotika, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, probiotické pivo, kyseláče, průtoková cytometrie

ABSTRACT

The presented diploma thesis is focused on the preparation and the monitoring of the biological stability of beer enriched with probiotics. Probiotic bacterial strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium bifidum* were used in this study.

The theoretical part is divided into two sections. In the first section, probiotics are generally characterized, and their role within a gut microbiota is described. Next, the microbiology of particular probiotic microorganisms including the genera of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* is described. Then, some factors influencing the viability and the growth of probiotics are stated. In this section, biological effects of probiotics on the human organism and their potential clinical applications are described. The second section of the theoretical part deals with the technology of brewing, the chemical composition of beer and particular beer styles.

In the experimental part, the methods of probiotic bacterial cell concentration and viability determination were optimized. Several techniques for determination of these parameters were selected, particularly the cultivation method, flow cytometry and the spectrophotometric measurement of turbidity. Then, the growth curves of the probiotic strains were measured in MRS medium. Probiotic bacteria were cultivated in model beer samples, i.e. in MRS media with several different concentrations of ethanol. It is possible to say that ethanol did not have significant effect on probiotics growth.

Next, experimental cultivations of individual probiotic bacteria and their mixtures in nine real beer samples were conducted. No increase of viable cells concentrations was detected in the samples. On the contrary, a decrease of the concentrations was observed, mainly in the samples with individual bacterial strains. However, certain values of viable cells concentrations were determined at the end of the cultivations in all cases.

A pale, top-fermented beer was brewed and supplemented with probiotics, and the concentrations of viable probiotic cells were monitored during 37 days of fermentation. A decrease of concentrations by two orders of magnitude of CFU/ml was observed in almost all samples. Yet, viable cells of probiotic bacteria were detected in all samples of beer at the end of the fermentation. Maximal concentration of viable probiotic cells in the brewed beer was determined with the cultivation method at $(3,80 \pm 0,14) \cdot 10^5$ CFU/ml. Chosen samples were analyzed with HPLC-RI method that quantified the common beer concentrations of ethanol in all chosen samples, lactic acid was not detected. Sensory analysis was conducted as well.

Based on the results of the experimental part and the bibliography, an optimal technology of the preparation of beer enriched with probiotics is discussed in this study.

KEYWORDS

probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, probiotic beer, sour ale, flow cytometry

CITACE

KOČNAR, Michal. *Příprava a stabilita piva s přidavkem probiotických bakterií* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-17]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115834>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval svojí vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Děkuji také konzultance Ing. Julii Hoové za čas věnovaný konzultacím teoretické i experimentální části. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Petře Matouškové, PhD., Ing. Jaromíru Pořízkovi, PhD., Ing. Lence Punčochářové a Ing. Marku Raptovi za velkou vstřícnost a pomoc s některými experimenty. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině, přátelům a kolegům za podporu a pomoc při zpracovávání této práce.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Probiotika.....	10
2.1	Historie probiotik.....	10
2.2	Střevní mikroflóra.....	12
2.2.1	Mikroorganismy střevní mikroflóry	12
2.2.2	Vznik a vývoj střevní mikroflóry.....	13
2.2.3	Význam střevní mikroflóry.....	14
2.3	Probiotické mikroorganismy	14
2.3.1	Obecná charakteristika probiotických mikroorganismů	15
2.3.2	Rod <i>Lactobacillus</i>	17
2.3.3	Rod <i>Bifidobacterium</i>	20
2.4	Faktory ovlivňující viabilitu a růst probiotik.....	24
2.4.1	pH prostředí	24
2.4.2	Teplota a teplotní změny.....	24
2.4.3	Přítomnost kyslíku	25
2.4.4	Antibiotika a jiné antimikrobiální látky.....	25
2.4.5	Prebiotika	25
2.5	Biologické účinky probiotik	26
2.5.1	Antimikrobiální metabolity probiotik	26
2.5.2	Interakce probiotik s imunitním systémem a imunomodulace	27
2.6	Klinické aplikace probiotik.....	28
2.6.1	Gastrointestinální choroby	29
2.6.2	Urologické a gynekologické choroby	30
2.6.3	Alergické a atopické choroby	30
2.6.4	Dávkování a bezpečnost probiotické terapie	31
3	Pivo	32
3.1	Historie piva a pivovarnictví	32
3.2	Suroviny pro výrobu piva	33
3.2.1	Voda.....	33
3.2.2	Slad	34
3.2.3	Chmel.....	37
3.2.4	Pivovarské kvasnice.....	38
3.3	Technologie výroby piva	39
3.3.1	Šrotování sladu.....	39
3.3.2	Vystírání.....	40
3.3.3	Rmutování.....	40

3.3.4	Scezování	40
3.3.5	Chmelovar	41
3.3.6	Chlazení a separace kalů	41
3.3.7	Kvašení	41
3.3.8	Závěrečné úpravy piva	42
3.4	Chemické složení a parametry piva	43
3.5	Druhy piv	44
3.6	Pivní styly	44
3.6.1	Ale	44
3.6.2	Porter	46
3.6.3	Stout	46
3.6.4	Lager	46
4	Experimentální část	48
4.1	Použité přístroje a vybavení	48
4.2	Použitý software	48
4.3	Použité chemikálie a jiný materiál	49
4.4	Použité kmeny mikroorganismů	49
4.5	Použité reálné vzorky piv	49
4.6	Kultivace probiotických bakterií v tekutém médiu	50
4.7	Optimalizace stanovení počtu a viability buněk probiotických bakterií	50
4.7.1	Přímé stanovení mikroskopickou metodou	50
4.7.2	Stanovení kultivační metodou	51
4.7.3	Stanovení metodou průtokové cytometrie	51
4.7.4	Stanovení spektrofotometrickým měřením zákalu	52
4.8	Růstové křivky použitých kmenů probiotik	53
4.9	Kultivace probiotických bakterií v modelových vzorcích piva	53
4.10	Kultivace probiotických bakterií v reálných vzorcích piva	54
4.10.1	Kultivace jednotlivých kmenů na mikrotitračních destičkách	54
4.10.2	Kultivace jednotlivých kmenů v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne	55
4.10.3	Kultivace směsí kmenů v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne	55
4.10.4	Kultivace směsí kmenů v plastových zkumavkách po dobu 9 týdnů	56
4.11	Příprava piva obohaceného probiotiky	56
4.11.1	Chmelovar	56
4.11.2	Chlazení a separace kalů	57
4.11.3	Zakvácení	57
4.11.4	Inokulace probiotickými kulturami	57
4.11.5	Hlavní kvašení	58
4.11.6	Dokvašování piva	58
4.12	Chromatografická analýza připraveného piva	58
4.13	Senzorická analýza piva obohaceného probiotiky	59

5	Výsledky a diskuze	60
5.1	Optimalizace stanovení počtu a viability buněk probiotických bakterií	60
5.2	Růstové křivky použitých kmenů probiotik	63
5.3	Kultivace probiotických bakterií v modelových vzorcích piva	66
5.4	Kultivace probiotických bakterií v reálných vzorcích piva	68
5.4.1	Kultivace na mikrotitračních destičkách	68
5.4.2	Kultivace v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne	73
5.4.3	Kultivace v plastových zkumavkách po dobu 9 týdnů	79
5.5	Charakterizace připraveného piva obohaceného probiotiky	80
5.6	Porovnání použitých metod stanovení počtu a viability buněk	87
5.7	Senzorická analýza piva obohaceného probiotiky	88
5.8	Návrh optimální technologie přípravy piva obohaceného probiotiky	90
6	Závěr.....	92
7	Seznam použitých zdrojů	94
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	100
9	Seznam příloh	102
10	Přílohy	103

1 ÚVOD

Probiotické mikroorganismy, často označované jednoduše jako probiotika, se v posledních desetiletích staly jedním z nejdiskutovanějších témat v problematice péče o zdraví. Již pradávno se člověk naučil využívat některých vlastností a schopností mikroorganismů ve svůj prospěch, zejména k přípravě fermentovaných potravin. Teprve na počátku minulého století však byla vyslovena myšlenka, že by určité mikrobiální druhy mohly svým přímým působením příznivě ovlivňovat zdraví člověka. Už v té době bylo odhadováno, že podstata blahodárných účinků probiotických mikroorganismů spočívá v působení na střevní mikroflóru člověka. K obrovskému nárůstu zájmu o probiotika potom došlo na přelomu 20. a 21. století, kdy byla také oficiálně formulována jejich nejpoužívanější definice.

V současnosti je význam probiotik v terapii a při prevenci různých onemocnění stále předmětem intenzivního výzkumu. Ukazuje se, že probiotické mikroorganismy mají z klinického pohledu vskutku velký potenciál. V této souvislosti jsou nejčastěji zmiňovány rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, ale také mnohé další mikroorganismy, zejm. bakterie mléčného kvašení.

Na trhu jsou dostupné nejrůznější probiotické preparáty, většinou ve formě doplňků stravy obsahujících bakterie zmíněných rodů, které jsou často užívány především při léčbě postantibiotických nebo cestovatelských průjmů. Probiotika je však také možno konzumovat jako součást různých probiotických potravin, v nichž se přirozeně vyskytují či do kterých se přidávají v rámci technologie jejich výroby. K takovým produktům patří mj. kysané mléčné výrobky, jejichž zdravotní prospěšnost je obecně známá a které jsou ve společnosti velmi oblíbené.

V budoucnu by se mezi probiotické potraviny mohlo zařadit také probiotické pivo, které je aktuálně vědecky studováno za účelem hledání optimální technologie přípravy i z hlediska stanovení výsledných chemických a biologických vlastností. V některých zemích patří pivo s obsahem bakteriálních kultur, např. *Lactobacillus delbrueckii*, k tradičním pivním stylům typickým pro daný kraj. Tato svrchně kvašená piva, vyznačující se vyšší kyselostí, se nazývají Sour Ale (česky tzv. kyseláče) a v poslední době jsou společně s dalšími speciálními druhy piva čím dál více vyhledávanými také v Česku. Pivo se obecně ve světě řadí k nejoblíbenějším nápojům a obzvláště u našeho národa se těší obrovské popularitě. Zdraví prospěšné pivo, obohacené probiotickými kulturami, by se tudíž mohlo ve společnosti setkat s velkým úspěchem.

Cílem této diplomové práce je příprava a studium biologické stability piva s přídavkem probiotik. Konkrétně je sledována míra přežití probiotických bakterií *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium bifidum* nejen v modelových a reálných vzorcích, ale také v připraveném pivu.

2 PROBIOTIKA

Pojem **probiotikum**, složený z latinské předpony *pro-* (podporující) a řeckého slova *bios* (život), vznikl v druhé polovině 20. století a byl v průběhu let používán v různých významech. Existovaly tedy rozdílné definice, které se však vždy shodovaly v důrazu na příznivý vliv probiotik na organismus. V 80. letech definoval Dr. Roy Fuller probiotikum jako aktivní potravinový doplněk obsahující živé mikroorganismy, který má pozitivní vliv na organismus hostitele tím, že zlepšuje rovnováhu jeho střevní mikroflóry [1]. Z této definice vychází současné chápání probiotik.

V roce 2001 uspořádaly Organizace Spojených národů pro výživu a zemědělství (FAO) a Světová zdravotnická organizace (WHO) kongres v argentinské Cordobě, kde formulovaly obecnou, dnes nejčastěji používanou definici probiotik. Náplní kongresu bylo studium živých kultur bakterií mléčného kvašení, obsažených v sušeném mléku, se zaměřením na jejich výživové vlastnosti a vliv na zdraví. Na podkladě dosažených výsledků definují FAO a WHO probiotika jako **živé mikroorganismy, které aplikovány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele** [2]. Tato definice je doporučována také Mezinárodní vědeckou asociací pro probiotika a prebiotika (ISAPP) [3].

Mezi **probiotické mikroorganismy** se řadí především zástupci bakterií mléčného kvašení (mj. laktobacily) a bifidobakterie, jsou zde však zastoupeny i jiné druhy bakterií a některé druhy kvasinek. Tyto druhy mikroorganismů mohou být u některých živočichů včetně člověka přirozenou součástí **střevní mikroflóry**, která společně se střevním epitelem a slizničním imunitním systémem trávicí soustavy tvoří tzv. **gastrointestinální ekosystém** [4]. V rámci něj se probiotika mohou podílet na některých procesech důležitých pro hostitelský organismus, např. přispívají k jeho obranyschopnosti nebo biosyntetizují různé zdraví prospěšné látky, zatímco hostitel jim poskytuje výživu a prostředí pro život. Probiotické mikroorganismy tedy žijí s hostitelským organismem v symbióze, přičemž jde o mutualismus, neboť obě strany mají z interakce prospěch [5].

Probiotika se v současnosti nacházejí na světovém trhu primárně ve třech kategoriích, a sice jako součásti potravin, doplňků stravy nebo léčivých přípravků [6]. Přirozeným zdrojem některých probiotických bakterií jsou **probiotické potraviny**, jedná se zejm. o kysané mléčné výrobky (např. jogurt, kefír, kumys nebo některé sýry), ale i jiné fermentované produkty [7]. Kromě probiotických potravin se lze setkat s **probiotickými preparáty**, které mohou být z hlediska evropské legislativy registrovány buď jako doplňky stravy, nebo jako léčiva [8].

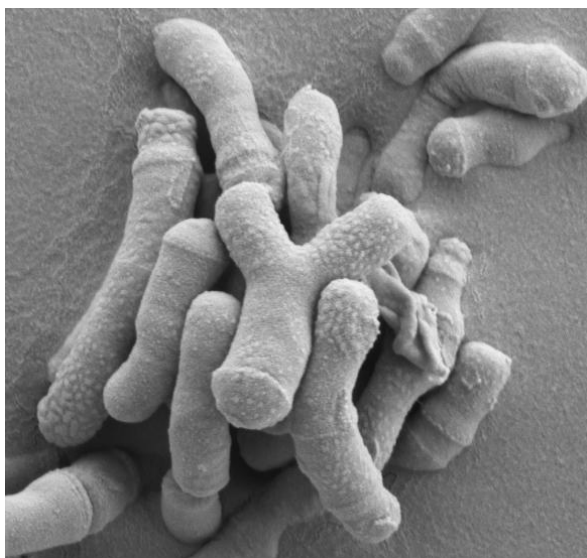
2.1 Historie probiotik

Ačkoli pojem probiotikum vznikl až ve druhé polovině 20. století, význam probiotických mikrobiálních kultur si lidé nepřímo uvědomovali už odpradáвна. Svědectví o zvyku přidávat mikroorganismy do mléka za účelem fermentace podávají již nástěnné malby pocházející ze starověkého Sumeru, které se datují do doby okolo roku 2 500 př. n. l. Příznivý vliv bakterií na zdraví konzumenta tehdejší obyvatelé pravděpodobně neuvažovali, avšak kvasné procesy jako tento, zachycený na sumerských malbách, se využívaly v různých částech světa pro

výrobu rozmanitých produktů. Hlavní význam spočíval v prodloužení trvanlivosti potravin a samozřejmě mnohdy i ve vylepšení jejich organoleptických vlastností [9, 10].

Na počátku minulého století se ruský vědec Ilja Iljič Mečnikov v rámci svého studia střevní mikroflóry zaměřil na zdravotní účinky potravin obsahujících probiotické mikroorganismy. Mečnikov byl v té době známý nejen svým výzkumem v oblasti imunologie, za nějž v roce 1908 obdržel Nobelovu cenu, ale také propagováním myšlenky, že určité mikroorganismy mohou potlačovat růst a životní funkce mikroorganismů jiných. Tuto koncepci tzv. **antibiózy** zamýšlel realizovat v praxi podáváním mikroorganismů pacientům za účelem zlepšení jejich zdravotního stavu. Při své práci Mečnikov pozoroval, že bulharští rolníci, kteří konzumují velké množství kysaných mléčných výrobků (kyselého mléka obsahujícího laktobacily), se zároveň dožívají vysokého věku. Usoudil, že dlouhověkost a konzumace fermentovaných mléčných produktů jsou přímo související jevy. Na základě toho pak vyslovil hypotézu, že pokud je předčasné a nepříjemné stárí způsobeno otravou tkání (zvláště tlustého střeva), potom prostředky potlačující hnilobné procesy ve střevech musí stárí oddalovat a zlepšovat. Mečnikov totiž věřil, že laktobacily z kyselého mléka osidlují intestinální trakt člověka a zde inhibují nadměrné množení proteolytické mikroflóry, tvořící jedovaté štěpné produkty bílkovin [7, 9]. Přestože se následně zjistilo, že „bulharské laktobacily“ kyselého mléka (dnes nazývané *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) nemají schopnost trvale osidlovat trávicí trakt člověka [9], Mečnikov díky své teorii antibiomy a myšlence jejího aplikování v klinické praxi v podstatě položil základ pro moderní výzkum probiotik.

Přibližně ve stejné době, na přelomu 19. a 20. století, pozoroval francouzský pediatr Henry Tissier, že děti trpící průjmem mají ve stolici snížený počet „bifidních“ bakterií (bakterií s nezvyklou morfologií ve tvaru písmene Y). Naopak u zdravých dětí byly tyto bakterie přítomny v hojném počtu. Proto navrhl, že „bifidní“ bakterie by mohly být podávány pacientům za účelem zlepšení jejich střevní mikroflóry [2]. Na Obr. 1 jsou zachyceny buňky bakterií *Bifidobacterium breve*, což je jeden z druhů osidlujících střevní trakt člověka [11].



Obr. 1: Buňky bakterie *Bifidobacterium breve* (snímek z elektronového mikroskopu) [12]

Po první světové válce byla z trávicího traktu izolována bakterie *Lactobacillus acidophilus*, která byla následně testována jako potravinový doplněk [9]. Během druhé světové války a v následujících letech došlo k rozmachu výzkumu i užívání antibiotik, a to nejen jako prostředků k léčbě bakteriálních onemocnění, ale také jako růstových faktorů při chovu hospodářských zvířat. V rámci výzkumu v této oblasti byly také provedeny mnohé experimentální studie, které prokázaly, že po terapii antibiotiky je jedinec náchylnější k infekci některými patogenními bakteriemi [9]. To bylo přičteno nepříznivému vlivu antibiotik na střevní mikroflóru, jejíž přirozenou součástí jsou také probiotické mikroorganismy. Zmíněný nežádoucí účinek při použití antibiotik jako růstových faktorů pro hospodářská zvířata doprovází také velké riziko rozšíření rezistence k antibiotikům a vzniku rezistentních populací patogenních bakteriálních kmenů [1, 9].

V návaznosti na omezení používání antibiotik jako růstových faktorů kvůli zmíněným jevům, ale také kvůli snaze potlačit nežádoucí účinky antibiotik na zažívání při humánní terapii bakteriálních chorob došlo koncem minulého století k nárůstu zájmu o probiotika a jejich výzkum. Výraznou osobností se v této oblasti stal Dr. Roy Fuller, jehož definice probiotika je ve své podstatě dodnes výstižná [1].

2.2 Střevní mikroflóra

Nejčastějším místem působení probiotik v lidském těle je trávicí soustava, do níž se po perorálním podání dostávají. Za účelem pochopení biologického účinku probiotických mikroorganismů je proto zapotřebí znát základní aspekty prostředí trávicího traktu člověka, jeho fyzikální, chemické a biologické vlastnosti.

Trávicí soustava (gastrointestinální trakt – GIT) člověka je orgánová soustava, jejíž primární funkcí je příjem a zpracování potravy za účelem získání živin (trávení) a následné vyloučení nestravitelných zbytků. Mimo to však GIT představuje největší tělesný povrch vystavený vnějšímu prostředí, neustále se setkávající s nejrůznějšími antigeny z potravy, okolního i vnitřního prostředí. Tudíž musí zabezpečovat jednak toleranci organismu k neškodným antigenům, avšak zároveň i vznik agresivní imunitní odpovědi na styk s patogenem [13]. Tato imunitní funkce GIT je zabezpečována **slizničním imunitním systémem trávicí soustavy** (*gut-associated lymphoid tissue* – GALT) [14, 15].

Kromě eukaryotických buněk lidského organismu zahrnuje GIT také živé buňky dalších organismů, konkrétně některých prokaryotických (bakteriálních), ale i eukaryotických mikroorganismů. Mikroorganismy přítomné v GIT se označují jako **střevní mikroflóra** (příp. střevní mikrobiota) a společně s epiteliálními a imunitními buňkami GIT vytváří tzv. **gastrointestinální ekosystém** [4]. Složky tohoto komplexního ekosystému mají vlastní funkce a mohou se do jisté míry vyvíjet izolovaně, avšak pro správnou morfologii a fyziologickou funkci trávicí soustavy je nutná přítomnost všech složek v rovnováze. Pokud je narušena rovnováha mezi organismy gastrointestinálního ekosystému v důsledku vrozeného či získaného faktoru, nastává patologický stav organismu [4, 5, 13].

2.2.1 Mikroorganismy střevní mikroflóry

Střevní mikroflóra je tvořena převážně prokaryotickými buňkami různých druhů bakterií. Na základě tzv. speciálních kultivačních metod se odhadovalo, že je v GIT zastoupeno 400 až

500 bakteriálních druhů s celkovým počtem řádově 10^{14} prokaryotických buněk, tedy více než buněk lidského organismu [4, 13, 15]. Následně se ovšem zjistilo, že pouze 20–40 % druhů lze kultivovat a identifikovat za použití známých kultivačních metod, ostatní druhy je nutné zkoumat metodami molekulárně-biologickými. Podle novějších výzkumů s využitím metod založených na stanovení sekvence deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je počet druhů bakterií vyšší než 40 000 [16].

Většina druhů bakterií střevní mikroflóry patří do kmenů *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Bacteroidetes* [5, 15, 17]. Zástupci jednotlivých kmenů [15] jsou uvedeni v Tab. 1.

Tab. 1: Zástupci bakterií střevní mikroflóry (G+ – grampozitivní, G– – gramnegativní bakterie)

Kmen (phylum)		Někteří zástupci (rodová jména)
<i>Firmicutes</i>	G+	<i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
<i>Bacteroidetes</i>	G–	<i>Bacteroides</i>
<i>Proteobacteria</i>	G–	<i>Escherichia coli</i> (nepatogenní kmen)
<i>Actinobacteria</i>	G+	<i>Bifidobacterium</i>

Složení střevní mikroflóry se mění kvantitativně i kvalitativně, a to vertikálně (podél trávicí trubice v různých částech GIT) i horizontálně (v jednotlivých vrstvách trubice). Z hlediska horizontální stratifikace lze mikroflóru rozdělit na **luminální**, osidlující průsvitnou část trubice, a **slizniční**, jež se nachází v slizničním hlenu, v Lieberkühnových kryptách nebo adherují přímo k epitelálním buňkám. Počet bakterií roste od začátku trávicího traktu (dutiny ústní) až po jeho konec (konečník), zatímco klesá oxidačně-redukční potenciál. V dutině ústní jsou přítomny aerobní a fakultativně i striktně anaerobní bakterie různých druhů; v žaludku je spektrum přítomných bakterií poněkud omezenější kvůli zdejší nízké hodnotě pH a vyšší rychlosti jeho vyprazdňování. Proximální části tenkého střeva obsahují převážně bakterie z vyšších částí GIT, kdežto distální části trávicí trubice (zejm. tlusté střevo) jsou osídleny téměř výhradně anaerobními bakteriemi, např. bakteroidy a bifidobakteriemi [4, 13].

Aby mohly bakterie žít v symbióze s lidským organismem jako součást střevní mikroflóry, musí snášet prostředí GIT, které osidlují. Vnější faktory působící na bakteriální buňky se liší podle části trávicí trubice, ve které je daná bakterie lokalizována. Patří mezi ně:

- nízká hodnota pH žaludku kvůli přítomné kyselině chlorovodíkové,
- působení enzymů (zejm. proteas a lysozymu),
- nízké povrchové napětí vznikající účinkem žlučových kyselin,
- pohyblivost (peristaltika) střev,
- rychlost průchodu tráveného materiálu [7].

2.2.2 Vznik a vývoj střevní mikroflóry

Střevní mikroflóru lze chápat jako **postnatálně získaný orgán trávicí soustavy** [13, 15]. Fetální trávicí trubice (GIT plodu) je totiž sterilní, k její kolonizaci dochází až po narození v důsledku okamžitého styku s nesterilním okolím. Vytváření a udržování střevní mikroflóry je komplexní proces, který může být ovlivňován mnoha faktory, např. způsobem porodu, složením potravy aj. [4].

Obecně se v GIT nejdříve vytváří kultura aerobních a fakultativně anaerobních bakterií, tzn. koliformních bakterií, laktobacilů a streptokoků. Tím pravděpodobně dochází ke snížení oxidačně-redukčního potenciálu ve střevě a je umožněna kolonizace anaeroby, především bifidobakteriemi a bakteroidy [4, 13, 15].

Při spontánním porodu začíná osídlení trávicí trubice novorozence již ve chvíli jeho styku s porodními cestami matky, následně je proces kolonizace výrazně ovlivněn způsobem výživy. Kojený jedinec má výhodnější skladbu střevní mikroflóry, v níž převažují bifidobakterie. Naopak u uměle živených novorozenců převažují koliformní bakterie, enterokoky a bakteroidy. U novorozenců na jednotkách intenzivní péče probíhá kolonizace pomaleji, bifidobakterie se ve střevě usazují později [13, 15].

Jakmile se jedinec začne živit pevnou stravou, složení střevní mikroflóry se stále více blíží konečnému stavu s převahou anaerobů. Ve věku čtyř let má již dítě plně vyžralou střevní mikroflóru s převahou anaerobů. Konkrétní složení se u jednotlivých jedinců velmi liší, a to v závislosti na genomu a fyziologii hostitele, průběhu kolonizace a dalších faktorech. V konečném stavu je kompozice mikroflóry poměrně stabilní, ovšem může docházet ke změnám vlivem různých chorob, při užívání antibiotik, probiotik, prebiotik nebo po výrazných změnách ve složení stravy. K podstatnějším změnám složení střevní mikroflóry dochází zase až ve stáří, kdy u starých lidí významně stoupá zastoupení klostridií a klesá počet bifidobakterií [4, 13, 15, 17].

2.2.3 Význam střevní mikroflóry

Mikroorganismy střevní mikroflóry hrají ve fyziologii člověka důležitou roli. Podílejí se na metabolismu některých látek, např. produkují **mastné kyseliny s krátkým řetězcem** (*short chain fatty acids* – SCFA), zejm. kyselinu octovou, propionovou a máselnou, a metabolizují primární žlučové kyseliny za vzniku **sekundárních žlučových kyselin**. Dále biosyntetizují některé **hydrofilní i lipofilní vitaminy**, např. kyselinu pantothenovou (vitamin B₅), biotin (vitamin H), pyridoxin (vitamin B₆) a menachinon (vitamin K₂). Produkce těchto vitaminů má pro člověka velký význam, v některých případech pokrývají mikrobiální zdroje jejich minimální potřebné množství. Mikroflórou jsou také biosyntetizovány ostatní hydrofilní vitaminy skupiny B, tj. thiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃) a kobalamin (B₁₂). Tyto ovšem nejsou ve střevech absorbovány, tudíž jejich produkce mikroorganismy v GIT nemůže pokrýt potřeby lidského organismu [5, 18].

Přítomnost střevní mikroflóry a produkty jejího metabolismu podstatně ovlivňují střevní funkce (absorpci, sekreci i motilitu). Anionty SCFA (acetát, propionát a butyrát) jsou zdrojem energie a výživy pro buňky GIT; plyny (vodík a metan) vznikající v důsledku mikrobiálního rozkladu vlákniny podporují střevní peristaltiku [15].

Střevní mikroflóra také významně přispívá k obranyschopnosti člověka. Brání kolonizaci GIT některými patogenními druhů účinkem různých mikrobiálních metabolitů a stimuluje imunitní systém (indukuje dozrávání buněk slizničního imunitního systému) [18].

2.3 Probiotické mikroorganismy

Jak již bylo zmíněno, probiotika jsou podle moderního pojetí označením pro skupinu živých organismů, tzv. **probiotických mikroorganismů**. Tím se rozumí všechny živé prokaryotické

i eukaryotické mikroorganismy, které splňují definici probiotik dle FAO a WHO, tedy při aplikaci v přiměřeném množství vykazují příznivý vliv na zdravotní stav hostitele [2].

2.3.1 Obecná charakteristika probiotických mikroorganismů

Základní požadavky, které musí probiotický mikroorganismus splňovat, jsou následující:

- musí být podrobně definován (včetně rodového, druhového a kmenového názvu),
- nesmí mít žádné patogenní vlastnosti,
- musí být odolný vůči trávicím sekretům,
- musí být schopen kolonizace tračníku,
- musí být schopen adheze ke střevnímu epitelu,
- musí mít příznivý účinek na zdravotní stav hostitele,
- musí být bezpečný,
- musí být aplikován v živém stavu [15].

Mikroorganismy používané jako probiotika lze v přírodě nalézt na mnoha různých stanovištích. Některé druhy se běžně vyskytují na rostlinných materiálech, živých či rozkládajících se. Z okolního prostředí se často dostávají do mléka, které jim poskytuje příznivé prostředí k růstu. Původním stanovištěm nejčastěji používaných probiotických mikroorganismů však není mléko ani vnější prostředí, ale trávicí trakt teplokrevných živočichů včetně člověka [7]. Humánní původ je u probiotik žádoucí, avšak není podmínkou [15]. Například kvasinka *Saccharomyces boulardii*, u níž byl prokázán probiotický účinek [19], se v lidském organismu běžně nevyskytuje [15].

Některé druhy probiotických mikroorganismů jsou často součástí fermentovaných potravin, k jejichž fermentaci může docházet buď spontánně, nebo po záměrné inokulaci. Zdrojem bakterií způsobujících samovolné kvašení může být příslušná matrice (např. mléko, obilí apod.), používané nástroje nebo okolní prostředí. Mnohé tradiční fermentační postupy, prováděné již odedávna, spočívají v inokulaci potravin již dříve prokvašenou kulturou (tzv. *back-slopping*). Například při přípravě jogurtu se výchozí surovina (mléko) inokuluje jogurtem připraveným v předchozím procesu. Časem byly izolovány, selektovány a domestikovány přesně definované startovací kultury mikroorganismů za účelem řízení fermentačního procesu a standardizace chuti i kvality výsledného produktu [13, 20, 21].

Mezi fermentované potraviny patří např. kysané zelí, kvašené okurky, kysané mléčné výrobky nebo fermentované salámy. Známým zdrojem probiotik jsou **kysané mléčné nápoje**, které vznikly původně samovolným zkysnutím mléka různého druhu dojníc v závislosti na ekologických podmínkách daného stanoviště. V mírném pásu vytvořily mezofilní bakterie mléčného kvašení obyčejné kysané mléko, zatímco v subtropickém pásu vznikl díky termofilním bakteriím mléčného kvašení klasický jogurt. Ve východních částech Evropy a v některých částech Asie vznikla působením směsných kultur bakterií a kvasinek specifická kysaná mléka s obsahem alkoholu (kefir, kumys). Dnes jsou tyto nápoje vyráběny potravinářským průmyslem komerčně a přisuzuje se jim blahodárný účinek na zdraví [7]. Množství živých mikrobiálních buněk ve fermentované potravine se liší zejm. podle typu produktu a způsobu fermentace; celkový počet může dosahovat až 10^9 buněk v gramu či mililitru potravin [20, 21].

Jak již bylo naznačeno, mikroorganismy používané jako probiotika se mohou vyskytovat mj. jako přirozená složka střevní mikroflóry. Jejich koncentrace zde však nebývá dostatečná pro terapeutický účinek, většinou ani pro účinek fyziologický [15]. Dodáváním probiotických mikroorganismů jako součástí fermentovaných potravin nebo v komerčních doplňcích stravy je možno předcházet různým onemocněním, např. syndromu dráždivého tračníku (*irritable bowel syndrome* – IBS), některým typům idiopatických střevních zánětů (*inflammatory bowel disease* – IBD), alergiím nebo obezitě [5]. Taktéž lze probiotika využívat k terapeutickým účelům, např. při léčbě zmíněných IBD, IBS, infekčních enterokolitid (postantibiotických nebo cestovatelských průjmů), infekcí bakterií *Helicobacter pylori*, jaterních chorob aj. [15].

Biologické účinky probiotik, jichž se při léčebných aplikacích využívá, jsou kmenově specifické. Pokud je tedy prokázán či vyvrácen konkrétní účinek u jednoho daného kmene, nelze takový výsledek automaticky (extrapolačně) přisuzovat jinému kmeni bez provedení příslušného testování [19]. Je také nutné poznamenat, že příznivé vlivy probiotických kmenů na zdravotní stav hostitelského organismu mohou být demonstrovány pouze na základě *in vivo* studií. Přesto však hrají *in vitro* metody významnou roli při hodnocení některých vlastností probiotik. Mezi nejdůležitější vlastnosti probiotických kmenů, které je nutné stanovit při posuzování daného kmene jako možného probiotika, patří:

- odolnost vůči kyselému prostředí v žaludku,
- odolnost vůči působení žlučových kyselin,
- adherence ke hleny a/nebo k lidským epiteliálním buňkám a buněčným liniím,
- antimikrobiální aktivita vůči potenciálně patogenním bakteriím a houbám,
- schopnost redukce adheze patogenu k povrchům,
- aktivita hydrolasy žlučových solí [23].

Někteří zástupci probiotických mikroorganismů jsou včetně svého systematického zařazení uvedeni v Tab. 2.

Tab. 2: Zástupci probiotických mikroorganismů [19]

Doména	Řád	Rod	Druhy (poddruhy)
Bacteria	Lactobacillales (bakterie mléčného kvašení)	<i>Lactobacillus</i>	viz Tab. 4
		<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
		<i>Enterococcus</i>	<i>Ec. durans</i> , <i>Ec. faecium</i>
		<i>Streptococcus</i>	<i>Sc. thermophilus</i>
		<i>Pediococcus</i>	<i>Pc. acidilactici</i>
		<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>
	Bifidobacteriales	<i>Bifidobacterium</i>	viz Tab. 6
	Bacillales	<i>Bacillus</i>	<i>Bc. coagulans</i> , <i>Bc. subtilis</i> , <i>Bc. cereus</i>
	Enterobacteriales	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> Nissle 1917
Eukarya	Saccharomycetales	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

Jak ukazuje Tab. 2, zástupci probiotických mikroorganismů nevytváří samostatnou taxonomickou kategorii. Mezi probiotika se řadí převážně mnohé druhy bakterií (doména *Bacteria*), z nichž samostatnou skupinu tvoří zástupci **bakterií mléčného kvašení**, tj. rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* a *Leuconostoc*.

Z dalších probiotických bakterií je možno zmínit především představitele rodu *Bifidobacterium* a dále některé kmeny rodů *Bacillus* a *Escherichia*. Významným probiotikem je i kvasinka *Saccharomyces boulardii* (doména *Eukarya*) [19].

Nejznámější a nejrozšířenější probiotické bakterie náleží do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, proto je o těchto rodech pojednáno podrobněji v následujících podkapitolách.

2.3.2 Rod *Lactobacillus*

Taxonomická klasifikace rodu *Lactobacillus*:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Lactobacillales*

Čeleď: *Lactobacillaceae*

Rod: *Lactobacillus*

Lactobacillus představuje vysoce heterogenní rod grampozitivních bakterií s různými biochemickými a fyziologickými vlastnostmi; poprvé byl popsán roku 1901 nizozemským botanikem a mikrobiologem M. W. Beijerinckem. Jedná se o nejpočetnější rod skupiny bakterií mléčného kvašení, zahrnující bakterie homofermentativní i heterofermentativní [21, 24].

Zástupci tohoto rodu se v přírodě vyskytují na stanovištích, které vyhovují jejich vysokým nárokům na výživu. Některé druhy je možno nalézt na povrchu neporušených rostlin, obvykle však v poměrně malých množstvích, protože zde nemají dostatečný přístup k sacharidům, které u nich tvoří základní složku výživy. Když dojde k porušení rostliny, počet laktobacilů vzroste, neboť jsou jim živiny zpřístupněny. V půdě se mohou vyskytovat jako součást rhizosféry rostlin, nebo se sem dostávají splavením z fylosféry [21].

Laktobacily bývají dominantní složkou mikroflóry většiny fermentovaných potravin, v některých případech se u potravin vyskytují i jako původci jejich kažení. Fermentace siláže, zeleniny a různých obilovin je způsobena laktobacily přítomnými již v daném surovém (rostlinném) materiálu a má význam např. při výrobě kysaného zelí, kvašených okurek a zeleninových směsí. Různé druhy jsou také součástí ovocných šťáv, jablečných moštů či ciderů, také mohou způsobovat kažení piva. U kysaných mléčných výrobků, kvásku či fermentovaného masa naopak zdrojem laktobacilů není surový materiál; bývá jím přidávána, již dříve fermentovaná kultura (tzv. *back-slopping*), nebo okolní prostředí. Například mléko po opuštění vemeny při aseptickém dojení tyto mikroby neobsahuje, ale dostávají se do něj z vnějšího prostředí prachem či z použitého mlékárenského zařízení [7, 21].

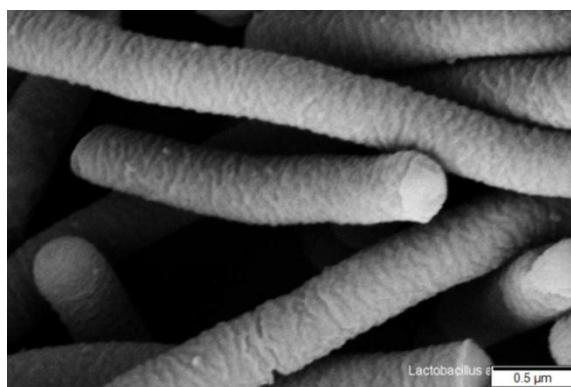
Některé druhy laktobacilů mohou být součástí orgánů živočichů bezobratlých (much, včel aj.) nebo obratlovců (ptáků, hlodavců, hospodářských zvířat a člověka). U lidí se nacházejí v různých částech GIT a ve vagíně [21]. Často se ovšem opomíjí skutečnost, že většina laktobacilů není schopna vytvářet v lidském intestinálním traktu stabilní a početně významné populace. V této souvislosti je nejvýznamnějším druhem *L. acidophilus*, který se pravděpodobně v GIT člověka a zvířat udomácněl. Jako u jediného z druhů byl u něj pozorován podstatně větší nárůst počtu buněk ve střevech po jeho týdenním podávání

v probiotickém doplňku stravy [19]. Další druh, který lze izolovat z prostředí lidského organismu, je *L. salivarius*. Typicky se nachází v ústní dutině, je však možné jej nalézt i ve střevech [7].

Morfologie buněk laktobacilů se může u různých druhů lišit, zpravidla jde o nepohyblivé, krátké až dlouhé tyčinky (příp. kokobacily), které nevytvářejí spory (základní vlastnosti buněk laktobacilů viz v Tab. 3). Buňky bakterie *L. acidophilus* jsou zachyceny na Obr. 2. Kolonie na agarových médiích mají většinou průměr 2 až 5 mm, mají pravidelný okraj, jsou bezbarvé, neprůhledné, lesklé, hladké, vypouklé [7, 25]. V tekutých médiích rostou pravidelně v celém objemu, odumírající buňky sedimentují. V běžných živných půdách nevytvářejí specifický zápach, při růstu v potravinách však přispívají k tvorbě charakteristických organoleptických vlastností díky biosyntéze některých těkavých látek, např. acetaldehydu, diacetylu, kyseliny octové, aminokyselin aj. [7].

Tab. 3: Základní charakteristika laktobacilů [7, 25]

Gramovo barvení	grampozitivní
Morfologie	dlouhé, úzké až kratší, koryneformní (kyjovité) tyčinky, rovné či ohnuté; příp. kokobacily (krátké tyčinky)
Velikost	0,5–1,2 μm \times 1,0–10,0 μm
Pohyblivost	nepohyblivé; vzácně pohyblivé díky peritrichním bičíkům
Kapsula	není přítomná
Spory	nejsou tvořeny



Obr. 2: Buňky bakterie *L. acidophilus* (snímek z elektronového mikroskopu)

Laktobacily jsou chemoorganotrofní organismy, velice náročné na živiny a růstové faktory, neboť jsou přirozeně adaptované na komplexní přírodní organické substráty. Jako zdroj energie a uhlíku jim slouží fermentovatelné sacharidy, dále je pro ně esenciální příjem nukleotidů, aminokyselin, vitaminů skupiny B, příp. dalších látek (konkrétní požadavky na výživu jsou druhově specifické). Požadavkům laktobacilů běžně vyhovuje živná půda obsahující fermentovatelný sacharid, pepton, masový extrakt a kvasničný autolyzát [7]. Ke kultivaci bakterií mléčného kvašení (včetně rodu *Lactobacillus*) se používá tzv. **deMan, Rogosa a Sharpe Broth**, resp. **Agar (MRS Broth, resp. MRS Agar)**, který obsahuje tryptický digest kaseinu, hovězí extrakt, kvasničný extrakt, glukosu, monooleát sorbitanu,

hydrogenfosforečnan draselný, síran hořečnatý, síran manganatý, citrát amonný, acetát sodný a destilovanou vodu (resp. také agar) [27].

Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou fakultativně anaerobní, příp. mikroaerofilní bakterie. Většina druhů je sice do značné míry aerotolerantní, avšak optimálního růstu se dosahuje při mikroaerofilních nebo anaerobních podmínkách. Jejich růst stimuluje zvýšená koncentrace (kolem 5 %) oxidu uhličitého v prostředí [7].

Všechny druhy laktobacilů jsou obecně acidotolerantní až acidofilní mikroorganismy. Nejlépe rostou ve slabě kyselých médiích o počáteční hodnotě pH mezi 6,4 až 4,5. Při fermentaci sacharidů však tvoří kyseliny (mléčnou a octovou), čímž snižují pH prostředí až pod 4,0. Jejich růst se zastavuje, jakmile pH média dosáhne hodnot 4,0 až 3,6 podle daného druhu a kmene [7].

Optimální teploty pro růst laktobacilů se liší u jednotlivých druhů, existují druhy rostoucí při 2 °C a na druhé straně druhy, které mají horní teplotní hranici až 53 °C [21]. Na optimální růstové teplotě (a metabolických drahách fermentace sacharidů) byla založena původní klasifikace laktobacilů dle Orla-Jensena, navržená roku 1919 [7, 21]. Laktobacily byly rozříděny do třech kategorií, tj. **termobakterie** (*Thermobacterium*, homofermentativní, rostoucí při vyšší teplotě), **streptobakterie** (*Streptobacterium*, homofermentativní, rostoucí při nižší teplotě), a **betabakterie** (*Betabacterium*, heterofermentativní, rostoucí při nižší teplotě). Do těchto vymezených skupin však později nebylo možné zařadit nově objevené druhy, proto se v současnosti používají jiné klasifikace laktobacilů [28].

Nejčastěji se rod *Lactobacillus* rozděluje na tři skupiny označované římskými číslicemi (I, II, III), přičemž toto rozdělení je založeno na typu fermentace (nezávisle na růstových teplotách zastoupených druhů):

- I. Obligátně homofermentativní laktobacily** fermentují hexosy téměř výlučně (z více než 90 %) na kyselinu mléčnou podle Embden-Meyerhofovy dráhy. Pentosy a glukonáty nefermentují.
- II. Fakultativně heterofermentativní laktobacily** také fermentují hexosy téměř výlučně (z více než 90 %) na kyselinu mléčnou podle Embden-Meyerhofovy dráhy, některé druhy však při omezeném přístupu k hexosám (při nedostatku glukosy) produkují i kyselinu octovou, ethanol a kyselinu mravenčí, příp. i oxid uhličitý. To je způsobeno fermentací pentos fosfoketolasovou drahou díky indukovatelné fosfoketolase.
- III. Obligátně heterofermentativní laktobacily** ve své enzymové výbavě postrádají fosfofruktokinasu, proto fermentují hexosy výlučně podle fosfoketolasové dráhy na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a oxid uhličitý. Pentosy fermentují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou [7, 29].

Laktobacily jsou z hlediska metabolismu na hranici mezi aerobním a anaerobním metabolismem [7]. Některé druhy si sice udržely schopnost respirace, obecně však všechny získávají energii převážně na úrovni substrátové fosforylace. Extracelulární glykosidasy u laktobacilů typicky nejsou přítomny, proto je metabolismus sacharidů téměř zcela závislý na transportu oligo- a monosacharidů a intracelulárním metabolismu (vzácně jsou přítomny extracelulární amylasy, inulinasy či xylanasy) [21]. U většiny bakterií mléčného kvašení jsou oligo- a monosacharidy přijímány ze substrátu pomocí **specifických přenašečů** sekundárním aktivním membránovým transportem. Jinou možností je příjem pomocí **ABC transportérů**

(z anglického *ATP-binding cassette transporters*), což jsou transmembránové proteiny, umožňující přenos některých sacharidů přes buněčnou membránu za spotřeby energie adenosintrifosfátu (ATP). Oligosacharidy jsou převedeny na monosacharidy působením intracelulárních glykosidas (např. laktosa je β -galaktosidasou štěpena na laktosu a galaktosu); monosacharidy jsou pak v buňce fosforylovány. U některých laktobacilů přecházejí volné monosacharidy do buňky za pomoci zvláštního transferasového systému, tzv. **fosfoenolpyruvát-dependentního fosfotransferasového systému** [7, 30].

Fermentace hexos probíhá v závislosti na jejím typu (homofermentativní či heterofermentativní mléčné kvašení) dvěma různými mechanismy:

V **Embden-Meyerhofově dráze**, která se uplatňuje při homofermentativním kvašení, je 1 mol hexosy je přeměněn na 2 mol kyseliny mléčné za vzniku 2 mol ATP [7, 29].

U heterofermentativního kvašení probíhá fermentace podle **fosfoketolasové dráhy**, jejímž klíčovým enzymem je **fosfoketolasa** (EC 4.1.2.9). Jedná se o lyasu, která katalyzuje fosforolytické štěpení xylulosa-5-fosfátu účinkem anorganického fosfátu (P_i) za vzniku glyceraldehyd-3-fosfátu a acetylfosfátu a uvolnění vody. Z 1 molu hexosy vznikne ve fosfoketolasové dráze 1 mol oxidu uhličitého, 1 mol ethanolu či kyseliny octové a 1 mol kyseliny mléčné, přičemž je vytvořen pouze 1 mol ATP. Další ATP může být syntetizováno v přítomnosti alternativního elektronového akceptoru (např. fruktosy). Poměr ethanolu a kyseliny octové je za aerobních podmínek závislý na přístupu kyslíku [7, 29].

Mnoho druhů laktobacilů má díky svým fyziologickým a biochemickým vlastnostem probiotické účinky. Nejčastější představitelé probiotik náležících k rodu *Lactobacillus* jsou uvedeni v Tab. 4, včetně některých jejich konkrétních účinků na zdraví člověka.

2.3.3 Rod *Bifidobacterium*

Taxonomická klasifikace rodu *Bifidobacterium*:

Doména: *Bacteria*
Kmen: *Actinobacteria*
Třída: *Actinobacteria*
Řád: *Bifidobacteriales*
Čeleď: *Bifidobacteriaceae*
Rod: *Bifidobacterium*

Bifidobacterium je rod grampozitivních heterofermentativních bakterií, které tvoří kyselinu octovou a kyselinu mléčnou jako kvasné produkty. Již na přelomu 19. a 20. století pozoroval francouzský lékař Henry Tissier v dětské stolici „bifidní“ bakterie, které byly později zahrnovány do rodu *Lactobacillus*. Existenci samostatného rodu *Bifidobacterium* zjistil v roce 1924 Orla-Jensen, přesto byly bifidobakterie kvůli podobnosti s ostatními bakteriemi mléčného kvašení řazeny k laktobacilům. Nakonec však jejich charakteristické morfologické, fyziologické a biochemické vlastnosti zapříčinily v roce 1957 definitivní zařazení bifidobakterií do rodu *Bifidobacterium* [7, 11]. Kvůli charakteristické tvorbě kyseliny mléčné jsou bifidobakterie často řazeny mezi bakterie mléčného kvašení, avšak od „pravých“ bakterií mléčného kvašení (laktobacilů, laktokoků, leukonostoků aj.) jsou fylogeneticky vzdáleny, tudíž náleží i do jiného kmene [31].

Tab. 4: Zástupci nejčastějších probiotik rodu *Lactobacillus* a jejich probiotické účinky [19]

Skupina	Druh (poddruh)	Některé známé probiotické účinky
I	<i>L. acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • léčba cestovatelského průjmu, • léčba průjmů způsobených bakteriemi <i>Clostridium difficile</i>, • zkrácení hospitalizace dětí s akutním průjmem, • redukce symptomů IBS, • prevence a léčba bakteriální vaginózy, • redukce incidence horečnatých infekcí močových cest u dětí, • antifungální aktivita.
	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • antibakteriální účinky proti bakterii <i>Escherichia coli</i>, • zvýšení systémové imunity u starších osob, • modulace mozkové aktivity.
II	<i>L. casei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • léčba funkční zácpy u dospělých, • léčba průjmů způsobených bakteriemi <i>Clostridium difficile</i>, • protekce proti infekcím bakteriemi <i>Salmonella</i>, • redukce trvání postantibiotických průjmů u geriatrických pacientů, • redukce symptomů IBS, • obnova vaginální flóry u pacientů s bakteriální vaginózou, • imunomodulační mechanismy.
	<i>L. rhamnosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • léčba akutní gastroenteritidy u dětí, • prevence nekrotizující enterokolitidy u novorozenců, • prevence a léčba bakteriální vaginózy, • redukce plicního poškození způsobeného viry, • prevence a redukce závažnosti atopické dermatitidy u dětí, • redukce rizika vytvoření alergického onemocnění, • antidiabetický potenciál.
	<i>L. plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • prevence tvorby endotoxinů, • redukce symptomů IBS, • antifungální aktivita.
III	<i>L. fermentum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • prevence a léčba bakteriální vaginózy, • potenciální redukce insulinové rezistence a hypercholesterolemie.
	<i>L. reuteri</i>	<ul style="list-style-type: none"> • léčba akutní gastroenteritidy u dětí, • zkrácení trvání průjmu u dětí, • redukce vzniku gastrointestinálních chorob u kojenců, • redukce četnosti prokázaných sepsí, • redukce nízkodenzitního lipoproteinu (<i>low density lipoprotein – LDL</i>), čili LDL cholesterolu

Původním stanovištěm bifidobakterií je GIT člověka a zvířat (savců). Různé druhy se vyskytují typicky ve střevech a stolici kojenců i dospělých, také však v ústní dutině a ve vagině. V intestinálním traktu je přítomnost bifidobakterií umožněna díky jejich poměrně vysoké toleranci ke žlučovým solím [19, 11].

Z hlediska morfologie se jedná o pleomorfní, koryneformní tyčinky, často paličkovité, větvcí se či s rozdvojeným koncem (tyčinky ve tvaru Y). Některé druhy příležitostně vytvářejí zduřelé kokovité formy. Bifidobakterie jsou až na výjimky nepohyblivé a netvoří spory. Někdy je u nich možno pozorovat párové uspořádání (do tvaru písmene V), jindy tvoří řetízky tyčinek v sérii za sebou nebo palisády či rosety tvořené paralelně uspořádanými tyčinkami. Na agarových médiích vytvářejí smetanově bílé, lesklé, hladké, vypouklé s hladkými okraji [7, 32]. Buňky bakterie *B. breve* jsou zachyceny na Obr. 1.

Tab. 5: Základní charakteristika bifidobakterií [7, 32]

Gramovo barvení	grampozitivní
Morfologie	pleomorfní, koryneformní (kyjovité) tyčinky, často paličkovité, větvcí se či s rozdvojeným koncem; příležitostně zduřelé kokovité formy
Velikost	0,5–1,3 μm \times 1,5–8,0 μm
Pohyblivost	nepohyblivé; výjimečně pohyblivé
Kapsula	není přítomná
Spory	nejsou tvořeny

Zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou chemoorganotrofní bakterie, které využívají sacharidy jako zdroj energie a uhlíku. Ke kultivaci jsou nutné komplexní živné půdy, je možno použít mj. **MRS Broth** či **MRS Agar** [32].

Zpravidla jde o striktně anaerobní mikroorganismy, avšak sensitivita ke kyslíku se může lišit u jednotlivých druhů i kmenů [11]. Například při přípravě probiotických jogurtů či nápojů na bázi bifidobakterií se používají kmeny za daných podmínek aerotolerantní. Obecně se optimálního růstu dosahuje při 10% koncentraci oxidu uhličitého v prostředí [7].

Bifidobakterie jsou acidotolerantní organismy, optimální hodnoty pH pro jejich růst se pohybují mezi 6,5 a 7. Při hodnotách pH nižších než 4,5 nebo vyšších než 8,5 k růstu nedochází. Optimální růstová teplota je 37 až 41 °C, přičemž nerostou při teplotách pod 20 °C a nad 46 °C [11].

Konkrétní metabolické vlastnosti jsou u rodu *Bifidobacterium* druhově až kmenově specifické, obecně jsou však schopny fermentovat celou řadu látek včetně různých druhů oligosacharidů, pektinu nebo žaludečního mucinu. Enzymová výbava bifidobakterií reflektuje jejich adaptaci na prostředí GIT člověka, v němž se běžně vyskytují. Zahrnuje enzymy, které umožňují utilizaci zdrojů poskytovaných prostředím hostitele, produktů ostatních organismů střevní mikrobioty i jiných zdrojů rostlinného či živočišného původu, které jsou součástí hostitelovy potravy [31]. Schopnost efektivně využívat pestřejší škálu sacharidů je pro bifidobakterie charakteristická a odlišuje je od jiných bakterií střevní mikrobioty. Jako příklad lze uvést tzv. **oligosacharidy mateřského mléka**, tedy skupinu nestravitelných oligosacharidů přítomných v lidském mateřském mléku. Tyto látky nejsou lidským organismem tráveny a nemohou být metabolizovány ani ostatními střevními bakteriemi

(kromě bakteroidů a některých kmenů laktobacilů), tudíž slouží v podstatě jako selektivní živiny pro střevní bifidobakterie (a bakteroidy, příp. laktobacily), a tím podporují jejich růst v GIT dítěte kojeného mateřským mlékem [31, 33].

Na rozdíl od laktobacilů produkují bifidobakterie celou řadu **extracelulárních glykosidas**, umožňujících štěpit komplexní sacharidy až na disacharidy, které mohou být následně transportovány do buňky [34]. Nejčastější mechanismus příjmu sacharidů spočívá u bifidobakterií ve využití **ABC transportérů**, které přenášejí některé monosacharidy (ribosu, xylosu) a oligosacharidy (laktosu, maltosu, rafinosu, fruktooligosacharidy aj.) přes buněčnou membránu za spotřeby energie ATP. Volné monosacharidy mohou být buňkou přijímány pomocí **fosfoenolpyruvát-dependentního fosfotransferasového systému** (podobně jako u laktobacilů). Působením intracelulárních enzymů může uvnitř buňky dojít k hydrolýze, fosforylaci, deacetylaci a/nebo transglykosylaci přijatých sacharidů [31].

Fermentace hexos probíhá po speciální, tzv. **bifidové dráze** (anglicky *bifid shunt*). Jejím charakteristickým enzymem je **fruktosa-6-fosfát-fosfoketolasa** (EC 4.1.2.22), která se od fosfoketolasy (EC 4.1.2.9) heterofermentativních bakterií mléčného kvašení (např. heterofermentativních laktobacilů) liší tím, že je duálně specifická. Bifidová dráha je 1,25krát účinnější než dráha Embden-Meyerhofova, z 1 molu hexosy totiž produkuje 1 mol kyseliny mléčné a 1,5 mol kyseliny octové za vzniku 2,5 mol ATP [31, 34].

Některé druhy bifidobakterií jsou pro své biologické účinky využívány v praxi jako probiotika. Nejčastější probiotické bifidobakterie jsou uvedeny v Tab. 6, včetně jejich biologických účinků.

Tab. 6: Zástupci nejčastějších probiotik rodu *Bifidobacterium* a jejich probiotické účinky [19]

Druh (poddruh)	Některé známé probiotické účinky
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • léčba funkční zácpy u dospělých, • redukce nekrotizující enterokolitidy u předčasných novorozenců, • redukce incidence horečnatých infekcí močových cest u dětí, • redukce celkového počtu mikrobů v zubním plaku, • redukce rizika onemocnění horních dýchacích cest, • redukce celkového cholesterolu, • modulace mozkové aktivity.
<i>B. bifidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • zkrácení hospitalizace dětí s akutním průjmem, • redukce nekrotizující enterokolitidy u předčasných novorozenců, • redukce celkového cholesterolu.
<i>B. breve</i>	<ul style="list-style-type: none"> • prevence a léčba nekrotizující enterokolitidy u novorozenců, • redukce celkového cholesterolu.
<i>B. infantis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • redukce nekrotizující enterokolitidy u předčasných novorozenců, • redukce symptomů IBS.
<i>B. longum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • léčba gastrointestinálních chorob, • prevence a léčba nekrotizující enterokolitidy u novorozenců, • redukce průjmu způsobeného ozařováním, • redukce symptomů IBS • perinatální intervence proti alergické senzitivaci.

2.4 Faktory ovlivňující viabilitu a růst probiotik

Probiotika jsou živé systémy a jejich viabilita (životaschopnost), růst i další životní funkce mohou být ovlivňovány různými fyzikálními, chemickými i biologickými faktory. V praxi je důležité znát podmínky produkce, zpracování a skladování probiotického výrobku, neboť tyto podmínky mají výrazný dopad na počet aktivních buněk probiotických mikroorganismů [35]. Viabilita je nutná pro účinek probiotik na hostitelský organismus, což je vyjádřeno i v definici dle FAO/WHO [2].

Na životaschopnost probiotik má vliv mnoho faktorů, mezi něž patří zejm. parametry prostředí (pH, titrovatelná acidita, přístup molekulárního kyslíku, vodní aktivita, přítomnost solí, cukrů a dalších chemikálií jako peroxidu vodíku, ethanolu, bakteriocinů aj.), technologické parametry (teploty při zpracování a inkubaci, rychlost chlazení produktu, druh obalového materiálu, metody skladování aj.) a mikrobiologické parametry (kmen použitého probiotika, poměr inokulace aj.). Stabilizace viability probiotik se řeší ochranou buněk vůči vnějším nepříznivým podmínkám, a to různými pokročilými technikami, nejčastěji metodou enkapsulace [35].

V následujících kapitolách je pojednáno o nejvýznamnějších faktorech ovlivňujících viabilitu a růst probiotik.

2.4.1 pH prostředí

Při nakládání s probiotiky je třeba uvažovat koncentraci vodíkových kationtů v prostředí, tzn. pH. Pokud jsou probiotické mikroorganismy obklopeny prostředím o příliš nízké hodnotě pH (pH < 4,5, ale i nižších, v závislosti od daného kmene [7]), musí vydat velké množství energie, aby zachovaly fyziologické intracelulární pH. To způsobí nedostatečnou koncentraci ATP pro udržení jiných nezbytných životních funkcí a následuje buněčná smrt [35].

2.4.2 Teplota a teplotní změny

Důležitým faktorem ovlivňujícím viabilitu probiotik je teplota. Optimální teplota většiny probiotik je v rozmezí 37–43 °C, přičemž při teplotách vyšších než 45 °C je vždy usmrcena alespoň část populace [35]. Vysoká teplota je pro probiotika škodlivá kvůli vlivům na bakteriální membránu, jejíž součástí jsou mastné kyseliny, citlivé k tepelnému poškození. Současně dochází za vysokých teplot k destabilizaci nekovalentních interakcí, a tudíž k denaturaci proteinů [36].

Skladování probiotik probíhá většinou při nízkých teplotách mezi 4–5 °C. Tolerance k nízkým teplotám je odlišná u různých probiotických mikroorganismů, v některých případech může docházet k částečným ztrátám viability kultury. Obecně snáší nižší teploty lépe laktobacily než bifidobakterie [35, 36].

Na buňky probiotik působí nepříznivě procesy mražení a tání. V průběhu mražení dochází k narušení integrity buněčné membrány probiotik a při tání se mohou projevovat nepříznivé efekty související s osmotickými jevy [35].

2.4.3 Přítomnost kyslíku

Různé druhy probiotických mikroorganismů se vyznačují odlišnou mírou tolerance ke kyslíku. Existují druhy striktně anaerobní (bifidobakterie), ale i aerotolerantní či fakultativně anaerobní (laktobacily) [7].

Kyslík je pro některé kmeny probiotik toxický, protože se v buňkách v jeho přítomnosti tvoří a akumulují určité toxické metabolity. Anaerobní organismy postrádají enzymy katalasu a superoxiddismutasu, které jsou schopny tyto metabolity rozkládat a detoxifikovat. Proto může oxidační stres, způsobený kyslíkem, vést k buněčné smrti v důsledku oxidativního poškození buněčných komponent [35, 36].

2.4.4 Antibiotika a jiné antimikrobiální látky

U probiotických mikroorganismů je důležité uvažovat jejich toleranci k terapeutickým dávkám **antibiotik**, neboť tato vlastnost může být žádoucí při podávání probiotik v rámci antibiotické terapie [36].

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou senzitivní k penicilinovým antibiotikům (penicilinu, ampicilinu), ale poměrně rezistentní k oxacilinu a cefalosporinům (cefoxitinu, ceftriaxonu). Z inhibitorů proteosyntézy jsou obecně senzitivní ke chloramfenikolu, erythromycinu, klindamycinu a tetracyklinům, o něco více rezistentní jsou k aminoglykosidovým antibiotikům (neomycinu, streptomycinu atd.). Laktobacily vykazují přirozenou (primární) rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům (vankomycinu, teikoplaninu) a k většině inhibitorů syntézy nukleových kyselin (chinolonů aj.) [37].

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou velmi senzitivní k antibiotikům grampozitivního spektra (bacitracinu, makrolidům, linkomycinu, vankomycinu, teikoplaninu), širokospektrým antibiotikům (chloramfenikolu aj.) a β -laktamovým antibiotikům (penicilinu, ampicilinu aj.). U tetracyklinů a cefalosporinů se jejich senzitivita různí. Naopak jsou však rezistentní vůči metronidazolu, aminoglykosidovým antibiotikům (neomycinu, streptomycinu atd.) a antibiotikům gramnegativního spektra (polymyxin B aj.). Některé kmeny však mohou být rezistentní také k vankomycinu, erythromycinu či dalším antibiotikům [37].

Bakterie mléčného kvašení patří k mikroorganismům velmi dobře tolerujícím **ethanol**. Některé z nich přežijí týdenní vystavení koncentracím až 20–24 % ethanolu. Podle jedné z provedených studií [38] se minimální inhibiční koncentrace (MIC) ethanolu u různých kmenů laktobacilů pohybuje v rozmezí 6–20 % a minimální baktericidní koncentrace (MBC) v rozmezí 6–25 %. V porovnání s jinými bakteriemi jsou to poměrně vysoké hodnoty, např. růst bakterie *Escherichia coli* je ethanolem inhibován už při koncentraci 6 % [38].

2.4.5 Prebiotika

Na růst, přežívání a aktivitu probiotických mikroorganismů působí příznivě skupina nestravitelných látek, zvaných **prebiotika**. Podle aktuální definice ISAPP jsou prebiotika substráty selektivně utilizované mikroorganismy hostitele, které mají pozitivní vliv na jeho zdraví [39].

Konkrétněji se jedná o sloučeniny, které splňují následující kritéria:

- nejsou hydrolyzovány ani absorbovány v horní části GIT,
- slouží jako selektivní substráty pro užitečné bakterie střevní mikrobioty,

- způsobují napravení či stabilizaci rovnováhy střevní mikroflóry,
- indukuje místní a/nebo systémové efekty působící příznivě na zdraví konzumenta [7].

Zmíněné vlastnosti splňují zejm. některé oligosacharidy a polysacharidy, peptidy, proteiny a lipidy. Důležitými prebiotiky jsou tzv. **bifidogenní faktory**, které podporují zejm. růst bifidobakterií a příp. i jiných bakterií střevní mikroflóry. Řadí se k nim laktulosa, *N*-acetyl-D-glukosamin (bifidus faktor 1), *trans*-glykosylované oligosacharidy aj. [7]. Známým zdrojem oligosacharidových prebiotik je lidské mateřské mléko, díky němuž je v kojeneckém věku podpořen růst prospěšných střevních bakterií [40]. Kromě bifidogenních faktorů mateřského mléka je významným prebiotikem **inulin**, tj. směs fruktooligo- a fruktopolysacharidů, a dále různé druhy vlákniny (pektiny, xylany, celulósa) atd. [15, 41].

Prebiotika mají příznivý vliv na zdraví konzumenta zprostředkovaně skrze metabolické produkty střevní mikroflóry, např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), usnadněním absorpce anorganických iontů či stopových prvků a zlepšením imunity konzumenta [39].

Preparáty obsahující současně probiotika a prebiotika se nazývají **synbiotika** [15].

2.5 Biologické účinky probiotik

Základní vlastností probiotik je jejich příznivý vliv na hostitelský organismus, jemuž jsou v přiměřeném množství podávány. Biologické účinky probiotik jsou kmenově specifické a mohou vznikat v důsledku různých mechanismů. Díky tomu mají probiotika potenciál pro aplikaci v medicíně při prevenci i terapii mnohých zdravotních obtíží a onemocnění.

Nejdůležitějším biologickým efektem probiotických mikroorganismů je jejich antimikrobiální aktivita. Té se v praxi využívá jak při konzervaci potravin fermentací, tak při aplikaci probiotik jako zdraví prospěšných doplňků. Základní mechanismy antimikrobiálního účinku probiotik proti patogenním mikrobům jsou následující:

- soutěžení o živiny a místa k adhezi,
- biosyntéza antimikrobiálních metabolitů,
- změna podmínek prostředí (snížení pH),
- modulace imunitní odpovědi hostitele (imunomodulace) [41].

2.5.1 Antimikrobiální metabolity probiotik

Hlavními antimikrobiálními látkami jsou **kyselina mléčná** a **mastné kyseliny s krátkým řetězcem** (SCFA), konkrétně kyselina mravenčí, octová, propionová a máselná. SCFA jsou biosyntetizovány jako konečné produkty fermentace mikroorganismů střevní mikroflóry, včetně některých probiotických mikroorganismů, a některé z nich mají význam mj. jako výživa pro buňky GIT hostitelského organismu. Kyselina mléčná je produkována do významných koncentrací probiotickými bakteriemi mléčného kvašení, homofermentativními i heterofermentativními. Produkci zmíněných organických kyselin dochází v prostředí ke snižování pH, což má však samo o sobě pouze částečný antimikrobiální účinek. Podstatnější efekt poklesu pH spočívá v přechodu organických kyselin do nedisociované formy, v níž jsou toxické pro patogenní mikroorganismy. Největší antimikrobiální aktivitu vykazuje kyselina mléčná a propionová, účinky kyseliny octové a mravenčí jsou podstatně mírnější [7, 13].

Nedisociované formy kyseliny mléčné a SCFA jsou základními antimikrobiálními metabolity probiotických bakterií s přímým účinkem proti patogenům. Jejich účinky spočívají

v penetraci buněčnými membránami a akumulaci v cytoplazmě, kde ovlivňují buněčné metabolické procesy. Tak dochází k inhibici růstu a nakonec k buněčné smrti [13].

Jinými antimikrobiálními látkami, biosyntetizovanými jako metabolity některých druhů laktobacilů, jsou **reuterin** (3-hydroxypropanal) a jeho deriváty. Tyto látky jsou produkovány jako intermediáty v metabolismu glycerolu (samotný reuterin vzniká dehydratací glycerolu) a jsou antimikrobiálně aktivní proti poměrně širokému spektru mikroorganismů, např. patogenní bakterii *Staphylococcus aureus* nebo plísním rodů *Aspergillus* a *Fusarium* [13].

Antifungální aktivitu proti některým plísním a kvasinkám mají některé **antifungální peptidy**, tvořené bakteriemi mléčného kvašení. Jsou přítomny v nízkých koncentracích s nízkou individuální aktivitou, mohou však působit synergisticky [13]. **Peroxid vodíku**, který je produkován ve významných množstvích zejm. laktobacily, má spíše aditivní účinek k dalším antimikrobiálním látkám [7].

Mnohé probiotické bakterie produkují tzv. **bakteriociny**, což jsou antibioticky působící látky peptidové nebo proteinové povahy, působící inhibičně především na producentovi příbuzné druhy nebo rody bakterií. Jsou tříděny do dvou skupin, z nichž první je představována **lanbiotiky** (nejznámějším zástupcem je nisin) a druhá je tvořena heterogenní skupinou ostatních bakteriocinů [7, 13].

2.5.2 Interakce probiotik s imunitním systémem a imunomodulace

Optimální funkce imunitního systému je klíčová pro dobré zdraví jedince. Deficience či dysregulace obranných funkcí organismu jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku infekčních, imunožánlivých, autoimunitních, metabolických a onkologických chorob. V současnosti se řeší prevence a terapie takových onemocnění převážně pomocí vakcín, antibiotik nebo jiných antimikrobiálních preparátů, což je však často spojeno s významnými nežádoucími účinky. U některých případů navíc tyto metody nemusí být účinné; vakcíny nemusí poskytovat kompletní ochranu nebo u antibiotik může docházet ke vzniku rezistence. Alternativním přístupem v problematice chorob spojených s poruchami imunity může být použití probiotik. Mnohé studie totiž prokázaly, že různé druhy probiotických mikroorganismů jsou efektivní při prevenci a regulaci těchto onemocnění, a to právě v důsledku interakce s imunitním systémem organismu [13].

Probiotické mikroorganismy jsou schopny zásahu do činnosti imunitního systému, a tedy modulace imunitních funkcí, tj. **imunomodulace**, a to na obou úrovních imunity organismu, čili na úrovni systémové i slizniční. Hlavním působištěm probiotik v těle je GIT, kde interagují se **slizničním imunitním systémem trávicí soustavy** (GALT) v rámci gastrointestinálního ekosystému. Kromě toho však byly dokázány také jejich účinky na **systémovou imunitu** organismu, přičemž může probíhat modulace jak vrozené (přirozené, nespecifické), tak i získané (adaptivní, specifické) imunity [13, 41].

Probiotika mohou provádět imunomodulaci v hostitelském organismu v důsledku několika mechanismů:

Jednou z možností je působení na **buňky střevního epitelu** (*intestinal epithelial cells* – IEC), které mají funkci bariéry, oddělující lidský organismus od vnějšího prostředí, a zároveň hrají důležitou roli v regulaci vrozených i získaných imunitních odpovědí v GIT. Mohou totiž

rozpoznávat a rozlišným způsobem odpovídat na různé bakterie a jejich produkty. Různé kmeny probiotických mikroorganismů jsou schopny stimulovat IEC k uvolňování pro- i protizánětlivých **cytokinů**. Jedná se látky regulující buněčnou komunikaci, z nichž mnohé hrají ústřední roli při imunitních odpovědích vrozené i získané obranyschopnosti. V konkrétních vlivech jednotlivých kmenů na produkci cytokinů existuje obrovská rozmanitost. Příkladem může být je interleukin 8 (IL-8), jehož produkci jsou některé kmeny laktobacilů (*L. plantarum*) schopny indukovat, jiné (*L. reuteri*) naopak inhibovat [13, 41].

Díky účinkům probiotických kmenů na indukci či inhibici uvolňování cytokinů mohou probiotika ovlivňovat různými způsoby funkci nejen slizniční, ale i systémové imunity. Probiotické bakterie totiž vyvolávají stimulaci tvorby cytokinů i u jiných buněk než IEC. Např. makrofágy uvolňují tumor-nekrotizující faktor α (TNF- α) a IL-10 kvůli interakci jejich povrchových receptorů s komponenty buněčných stěn probiotik jako je kyselina lipoteichoová [41].

Další způsob spočívá ve vlivu na funkci **slizniční střevní bariéry** GIT, jež poskytuje fyzickou ochranu před nežádoucím přenosem potravinových a mikrobiálních antigenů přes střevní sliznice. Porušená funkce slizniční bariéry je charakteristickým znakem potravinových alergií nebo zánětlivých střevních onemocnění. Při prevenci či nápravě poškození slizniční bariéry se ukázala být účinná konzumace probiotických mikroorganismů, které mají schopnost stimulovat tvorbu různých ochranných molekul, např. **defensinů**, a některých protilátek, tzv. **sekrečních imunoglobulinů A** (sIgA). sIgA je hlavním imunoglobulinem slizničních povrchů a hraje ústřední klíčovou roli v ochraně sliznic hostitele a udržování jejich homeostázy. Probiotika mohou také tlumit zánětlivé odpovědi organismu, indukovat tvorbu mucinu a cytoprotektivních proteinů nebo redukovat bakteriální adhezi. V neposlední řadě produkují trofické faktory a nutriety pro buňky GIT [13].

Vrozená imunita hostitele je ovlivňována probiotickými mikroorganismy díky jejich schopnostem zvyšovat **fagocytickou aktivitu leukocytů periferní krve**, konkrétně monocytů/makrofágů a granulocytů (neutrofilů), i **cytotoxickou aktivitu NK buněk** (*natural killer cells*) a jejich počet v krvi. Tyto jevy mohou být spojeny s protizánětlivými a protirakovinnými účinky probiotik [13, 41].

Vliv na adaptivní imunitu mají probiotika zejm. díky **stimulaci B-lymfocytů** k produkci protilátek typu IgA a **aktivaci pomocných T-lymfocytů** (Th-lymfocytů) díky podněcování tvorby cytokinů. V důsledku těchto efektů může docházet k zesílení imunitní odpovědi na konkrétní patogeny [13, 41].

2.6 Klinické aplikace probiotik

Již před více než sto lety spatřoval I. I. Mečnikov velký potenciál v aplikaci mikroorganismů při zlepšování zdraví. Na jeho teorii antibiomy je postavena tzv. **mikrobiální interferenční terapie**, jejímž principem je podávání živých mikroorganismů (převážně lidského původu) za účelem změny a stabilizace střevní mikroflóry s následným pozitivním vlivem na zdravotní stav pacienta, prevenci některých onemocnění či zlepšování jejich průběhu. Lze tedy říci, že mikrobiální interferenční terapie je metodou biologické terapie, využívající probiotika (probiotické mikroorganismy) [42].

Rozlišují se tři generace probiotik:

1. **probiotika první generace (nativní probiotika)**, izolovatelná z přirozených zdrojů;
2. **probiotika druhé generace (rekombinantní probiotika)**, která lze připravit metodami genového inženýrství za účelem vylepšení určitých vlastností daného mikroorganismu (např. zlepšení adheze ke střevnímu epitelu, sekrece a cílená aplikace biologicky aktivních molekul aj.);
3. **probiotika třetí generace (chimérická probiotika)**, jež se také připravují metodami genového inženýrství, přičemž se upravuje mikrobiální povrch daného mikroorganismu přenesením genů z genomu jiného mikroorganismu [42].

Probiotika byla testována s pozitivními či slibnými výsledky u mnoha onemocnění, nejčastěji se jedná o choroby gastrointestinálního a urogenitálního traktu, ale také choroby jaterní či alergické a atopické, popř. i jiné [13, 15].

2.6.1 Gastrointestinální choroby

Velké množství studií se zaměřuje na použití probiotik v prevenci či při léčbě různých průjemových onemocnění. Jednou z možných příčin jejich vzniku je antibiotická terapie. Při užívání antibiotik totiž dochází k negativnímu ovlivňování střevní mikroflóry, což může vést ke snížené rezistenci k oportunním patogenům, jako např. *Clostridium difficile*, a může dojít ke vzniku infekční enterokolitidy doprovázené tzv. **postantibiotickými (klostridiovými) průjmy** [6, 15]. Jiným případem je **akutní (rotavirový) průjem u dětí**, jehož příčinou jsou virové infekce. Rotaviry infikují jedince a replikují se v diferencovaných absorpčních buňkách epitelu tenkého střeva, což vyvolá částečné narušení střevní sliznice [41]. Při návštěvách zemí s nízkou hygienickou úrovní může dojít ke vzniku tzv. **cestovatelských průjmů**, jejichž příčinou je obecně narušení rovnováhy střevní mikroflóry. Většina experimentálních prací zaměřených na prevenci a léčbu popsaných průjemových onemocnění (infekčních enterokolitid) byla provedena se směsmi několika probiotických kmenů, s jednotlivými kmeny bakterií *Lactobacillus* nebo s kvasinkou *Saccharomyces boulardii*. Při podávání těchto probiotických mikroorganismů v rámci terapie bylo trvání průjmů zkráceno o 1 až 3 dny [13]. Přitom účinnost probiotik závisí nejen od použitého kmene, ale důležité je i dávkování [41].

Syndrom dráždivého tračníku (*irritable bowel syndrome – IBS*) je funkční onemocnění GIT, charakterizované symptomy břišního dyskomfortu či bolestí břicha, spojené s poruchou funkce vyprazdňování. Jedná se o jednu z nejčastějších gastrointestinálních chorob. Při vzniku IBS hraje roli několik mechanismů, k nimž patří psychologické faktory, změněná střevní motilita, nerovnováha neurotransmiterů nebo infekce aj. [41]. Možným etiologickým faktorem IBS je také nerovnováha střevní mikroflóry, konkrétně snížený počet bifidobakterií a změny v zastoupení druhů laktobacilů. Užívání probiotik, např. *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces boulardii* nebo kombinací probiotických kmenů, v léčbě IBS může mít podle mnohých experimentálních studií za následek znatelné zmírnění symptomů [13, 41]. Probiotika zde působí zkrácením trvání průjmů, stabilizací slizniční bariéry a inhibicí její translokace [15].

Idiopatické střevní záněty (*inflammatory bowel disease – IBD*) jsou označením pro skupinu chorob, jejichž společným znakem je chronický zánět GIT. Mezi IBD se řadí

ulcerózní kolitida (*ulcerative colitis* – UC, jiným názvem idiopatická proktokolitida), **Crohnova nemoc** (*Crohn's disease* – CD) a **pouchitida**. Mechanismus vzniku těchto nemocí spočívá v selhání odpovědi slizničního imunitního systému na antigenní látky ve střevním obsahu (např. antigeny střevní mikroflóry) u geneticky disponovaného jedince. Slizniční imunitní systém u pacientů s IBD reaguje na tyto antigeny imunogenní reakcí [13, 15]. Možné působení probiotik při léčbě těchto chorob je založeno na degradaci střevních antigenů, normalizaci mikroflóry, udržování střevní bariéry a redukci sekrece mediátorů imunitní odpovědi. Některé studie prokázaly účinnost probiotických preparátů v terapii UC a pouchitidy s poměrně slibnými výsledky, avšak v případech CD nebyla probiotika dosud použita s úspěchem [6, 41].

Nekrotizující enterokolitida (*necrotizing enterokolitis* – NEC) je závažné onemocnění novorozenců, způsobující zánět a nekrózu v oblastech střeva. Vyskytuje se především u předčasných novorozenců, přičemž mortalita se pohybuje mezi 15–30 %. Etiologie této choroby není dosud zcela objasněna, předpokládá se však, že je spojena s abnormální bakteriální kolonizací střevní sliznice. Z některých experimentálních studií vyplynulo, že použití probiotik může redukovat výskyt NEC. Proto např. v mnoha nemocnicích ve Spojeném království došlo k zavedení běžné praxe podávání probiotik předčasným novorozencům [6, 13].

Kromě zmíněných chorob se použití probiotik diskutuje i u dalších případů. Působení probiotik při **infekcích *Helicobacter pylori*** spočívá ve snížení aktivity některých enzymů této bakterie, poklesu obsahu polyaminů v žaludeční sliznici a také v mírnění nežádoucích účinků při léčbě těchto infekcí antibiotiky. Nutno však poznamenat, že přímý eradikační účinek na *H. pylori* nevykazují. Užívání probiotik může být také vhodné u pacientů s **intolerancí laktosy**, jejíž příčinou je nedostatek laktasy, produkované enterocyty. Tento deficit může být kompenzován podáváním mikrobiálních laktas nebo laktobacilů, které laktosu využívají. Jiným způsobem je náhrada mléka ve stravě za kvašené mléčné výrobky, které jsou pacienty lépe tolerovány díky laktasové aktivitě jogurtových (probiotických) kultur [13, 15].

2.6.2 Urologické a gynekologické choroby

Laktobacily jsou přirozenou součástí vaginální mikroflóry, kde se podílejí na udržování kyselého prostředí. Při vzrůstu pH dochází ke snižování zastoupení laktobacilů a může dojít k infekci patogeny. Probiotika (*Lactobacillus* spp.) jsou pak alternativním přístupem k lokální terapii vaginálních bakteriálních a kvasinkových zánětů, tzv. **bakteriálních vaginóz**, které se jinak řeší podáváním antibiotik [15]. Také jsou probiotické mikroorganismy zmiňovány v souvislosti s prevencí **vulvovaginální kandidózy** a **infekcí močových cest** [13].

2.6.3 Alergické a atopické choroby

Probiotika zasluhují pozornost také jako doplňková metoda terapie alergických a atopických chorob [15]. Alergické reakce jsou způsobeny agresivními imunitními odpověďmi na neškodné antigeny prostředí u geneticky disponovaných jedinců. Se vznikem alergických onemocnění bývá spojována snížená či nepatřičná expozice mikroorganismům v raném období života [13].

Příkladem jsou **atopické ekzémy**, tj. zánětlivá kožní onemocnění, charakterizovaná svěděním, zarudnutím a ztloustnutím či šupinatěním kůže. Někdy jsou doprovázeny rýmou či astmatem. V rámci několika studií bylo zjištěno, že probiotika mohou snížit riziko vzniku těchto ekzémů u dětí, pakliže jsou konzumována jejich matkami v posledním trimestru těhotenství, matkami kojícími či přímo kojenci. Užívání probiotik v některých případech doporučuje i Světová alergologická organizace (WAO) [6].

2.6.4 Dávkování a bezpečnost probiotické terapie

Fyziologický účinek probiotik je předpokládán při koncentraci 10^8 CFU/g preparátu, terapeutický účinek při koncentraci minimálně 10^{10} CFU/g. Účinnost konkrétního probiotika je však závislá na množství mikrobiálních buněk v cílovém místě, kde má působit. Toto množství je závislé na míře přežití daného mikroorganismu při transportu k cílovému orgánu v hostitelském organismu, tzn. většinou při cestě trávicím traktem [15]. Dále se uvádí, že v probiotických potravinových produktech (jogurtech, acidofilních mlékách atd.) mají být pro požadovaný účinek probiotické mikroorganismy v době expirace přítomné v koncentraci větší než 10^6 CFU/ml [7].

Probiotika jsou obecně nepatogenní organismy, z nichž některé jsou dokonce přirozenou součástí střevní mikroflóry. Vedlejší nežádoucí účinky probiotické terapie jsou tudíž vzácné. Navzdory vysokému stupni bezpečnosti je však nutno brát v úvahu určitá rizika spojená s užitím probiotik. K diskutovaným otázkám patří:

- možný přenos geno- a cytotoxických substancí, např. u probiotického kmene *E. coli*;
- přenos genů antibiotické rezistence;
- problematika používání probiotik v peri- a neonatálním období, kdy může dojít k nepřírozenému zásahu do vývoje střevní mikroflóry;
- problematika používání probiotik u imunosuprimovaných a polymorbidních pacientů, u nichž může dojít ke vzniku druhotné infekce [15].

3 PIVO

Pivo je oblíbený fermentovaný nápoj, jehož historie sahá až do pravěku [43]. Český výraz „pivo“ je slovanského původu a znamenal původně nápoj obecně (pivo – „co je k pití“), později se význam zúžil do jeho dnešního smyslu [44]. V současnosti je pivo ve většině částí světa zcela nejoblíbenějším alkoholickým nápojem, přičemž Češi jsou jeho absolutně největšími konzumenty [43]. Spotřeba piva se v České republice v posledních letech pohybuje mezi 140 a 150 litry na osobu a rok [45].

Podle Vyhlášky č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí, se pivem rozumí *„pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových výrobků, který vedle kvasným procesem vzniklého etanolu a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu; slad lze do výše jedné třetiny hmotnosti celkového extraktu původní mladiny nahradit extraktem zejména cukru, obilného škrobu, nesladovaných obilovin nebo rýže; u piv ochucených může být obsah alkoholu zvýšen přidavkem lihovin nebo ostatních alkoholických nápojů“* [46].

3.1 Historie piva a pivovarnictví

Není možné přesně určit, kdy a kde bylo pivo připraveno poprvé, avšak podle některých archeologických nálezů lze usoudit, že zkvašené obilné nápoje znali lidé již v neolitu, tj. v mladší době kamenné. První vznikly pravděpodobně souhrou náhod, možná zkvašením obilí v dešťové vodě [43, 47].

Za éry starověku pěstovali obyvatelé Mezopotámie zejména ječmen, pšenici a proso a z nich také připravovali tradiční kvašené nápoje. Sumerové vařili tzv. *kaš* a Babyloňané *šikarum*. Ve starověkém Egyptě patřilo pivo k základním součástem stravy, a to ve všech společenských vrstvách od faraona až k rolníkům. A pivo znali také v Palestině, v Řecku i ve starém Římě, kde však bylo oblíbenější víno [47].

Klíčovou roli ve vývoji piva do jeho dnešní podoby hrály evropské kláštery v raném středověku. Konzumace některých alkoholických nápojů byla mezi tehdejšími řeholníky běžnou praxí, často zakotvenou i v pravidlech řádů. Denní příjem vína pro řeholníky ustanovila již tzv. Benediktova řehole, soubor pravidel pro mnišské řády, tradičně připisovaný svatému Benediktovi z Nursie, který žil na přelomu 5. a 6. století. Pivo bylo pravděpodobně pro mnichy povoleno později. Na koncilech v Cáchách (v letech 816 a 817) pak došlo k usnesení, že řeholník má denně dostat pintu piva nebo půl pinty vína. Kláštery, které v té době čítaly mnohdy až 400 řeholníků a přibližně stejný počet sluhů, proto často vlastnily velké **klášterní pivovary** [43].

Mezi suroviny pro výrobu piva patřil již ve středověku obilný slad, avšak dlouhou dobu převažovala pšenice, ze které se vyrábělo tzv. **bílé pivo**. Ječmen se používal pouze jako vedlejší surovina, vařilo se z něj tzv. **červené pivo**. Až v 17. století došlo k rozmachu sladování ječmene, který se nakonec stal hlavní surovinou pro výrobu piva [48]. Místo dnes používaného chmelu se v raných dobách tradičně přidávala kořenící směs různých bylin, tzv. **gruit**. Zhruba od poloviny 10. století kontrolovaly kláštery licenci pro výrobu této směsi,

a tak si mohly ve výrobě piva do jisté míry udržet monopol až do chvíle, kdy při jeho kořenění převážil chmel [43].

První zmínky o výrobě piva v českých zemích jsou spojeny s Břevnovským klášteřem. Podle pramenů tamní benediktini již na konci 10. století vařili pivo a víno. Je pravděpodobné, že tyto nápoje se připravovaly i v jiných, starších kláštěrech, avšak zprávy o tom se nedochovaly [47].

Ve středověku však pivovarnictví nebylo pouze výsadou duchovenstva, naopak příprava piva patřila mezi typické domácí práce. Nejprve si pivo vařila každá domácnost sama a tradiční postup se předával z generace na generaci. Od 12. století u nás docházelo k zakládání měst, které byly později nadány různými privilegii, což významně přispělo k rozvoji řemesel. Mezi starobylé výsady měst patřilo také **právo várečné a právo mlíové** (později **obvodové**), jež byly důležité pro nástup středověké řemeslné výroby piva. Oficiálně však bylo ve středověku řemeslem pouze sladovnictví (tj. výroba sladu), zatímco pivovarství bylo považováno za obchod. Z toho důvodu se také dodnes vedoucí výroby pivovaru nazývá **sládkem** a přitom se tradičně oslovuje „pane starý“, neboť v době cechovní výroby zasedali v čele představenstva starší sládkové [47].

Technologie výroby piva se v průběhu středověku a raného novověku průběžně zlepšovala [47], avšak stále byla založena převážně na empirickém přístupu. Až od poloviny 19. století se do pivovarnictví rychle přenášely poznatky z vědních a inženýrských disciplín, které po průmyslové revoluci zažívaly obrovský rozmach. Pivovarství se tak postupně stává průmyslovým odvětvím [49].

V poslední době je vzhledem k vysoké konkurenci trendem intenzifikace výroby uplatňováním moderních vědeckých a technologických postupů. Na jedné straně tak vznikají velké pivovarské společnosti, na druhé straně je však stále poptávka po produktech vyráběných tradičními postupy, které jsou dnes nabízeny četnými **minipivovary** [49].

3.2 Suroviny pro výrobu piva

V současnosti jsou základními surovinami pro výrobu piva **voda, slad a chmel**. Z těchto tří složek se pivo připravuje zkvašením pomocí **pivovarských kvasnic**, tj. určitých druhů kvasinek z rodu *Saccharomyces*.

3.2.1 Voda

Voda patří mezi nejzákladnější suroviny v pivovarnictví, objemově se jí spotřebuje ze všech výchozích surovin nejvíce. Na výrobu 1 litru piva se použije až 12 litrů vody, z čehož 20 až 30 % představuje **varní voda**. V minulosti se čerpala z pivovarských studní a nijak se neupravovala, dnes však jejímu použití často předchází různé kroky (např. koagulace, sedimentace, filtrace, působení ultrafialového záření). Varní voda, ale i voda technologická, musí splňovat kritéria pro pitnou vodu [48, 49, 50].

Složení používané varní vody, především obsah jednotlivých anorganických iontů, významně ovlivňuje jak procesy probíhající během výroby piva, tak i charakter a kvalitu výsledného produktu. Hlavním sledovaným parametrem je **tvrdost vody**, tj. obsah kationtů kovů alkalických zemin (a hořčíku), z nichž však mají v praxi význam především kationty vápenaté a hořečnaté. Rozlišuje se tvrdost přechodná (karbonátová) a trvalá (nekarbonátová),

příčemž přechodná tvrdost je způsobena hydrogenuhličitany a lze ji odstranit varem nebo vápennou vodou. Na odsolování se dříve používaly iontoměniče, které však byly nahrazeny aplikací reverzní osmózy [48, 50]. Podle množství obsažených kationtů se rozlišuje voda velmi měkká, měkká, středně tvrdá, dosti tvrdá, tvrdá a velmi tvrdá [49].

Na základě složení používané vody se v různých oblastech Evropy vyvinulo několik základních druhů piva. Oblasti (názvy měst) jejich vzniku daly název nejen těmto druhům pív, ale i pro ně charakteristické varní vodě. Existují tedy čtyři základní typy pivovarské vody:

1. **plzeňská voda** (měkká),
2. **mnichovská voda** (dosti tvrdá s nízkým obsahem síranů a chloridů),
3. **dortmundská voda** (velmi tvrdá s nižší karbonátovou tvrdostí),
4. **vídeňská voda** (velmi tvrdá s vyšší karbonátovou tvrdostí) [48].

Anorganické ionty mohou mít různý význam v technologii výroby i v kvalitě výsledného piva. Mezi nejvýznamnější kationty patří **vápník**, který podstatně snižuje pH sladiny a mladiny, ale také reaguje s přítomnými organickými sloučeninami. Reakcí s kyselinou šťavelovou vzniká šťavelan vápenatý, který může způsobovat přepěňování piva. **Hořčík** se také podílí na snižování pH a dále je společně s **manganem** významný pro aktivitu některých enzymů. Mangan a zejména **železo** může v hotovém pivu způsobit přibarvování pěny, železo také podporuje oxidační procesy. **Sodík** a **draslík**, vyskytují-li se ve vyšších koncentracích, propůjčují pivu slanou příchuť. Z aniontů jsou důležité **hydrogenuhličitany**, zvyšující pH, a **sírany**, které se účastní enzymatických procesů. **Chloridy** mohou ve větším množství působit nepříznivou slanou chuť piva [48].

3.2.2 Slad

Slad je naklíčené a následně usušené obilné zrna [43]. Vyrábí se v procesu **sladování** z různých obilovin, tedy nejčastěji z ječmene (**ječný slad**), ale také z pšenice, kukuřice, rýže, výjimečně i z ovsa či žita [51].

Sladovnický ječmen je pro pivovarský průmysl nejdůležitější surovinou. Systematicky náleží ječmen (rod *Hordeum*) do čeledi lipnicovitých rostlin, přičemž existuje mnoho druhů a variet [48]. Kulturní ječmeny jsou buď jarní, seté na jaře v březnu, nebo ozimé, seté na podzim. V sladařství se rozlišují ječmeny víceřadé (*polystichum*) se 4 až 6 zrny v rovině průřezu klasu a dvouřadé (*distichum*) se 2 zrny, které lze dále dělit na vzpřímené (var. *erectus*) a nící (var. *nutans*) [47]. Na našem území se pěstují vybrané odrůdy jarního, dvouřadého, nícího **ječmene setého** (*Hordeum distichum* var. *nutans*; nověji *Hordeum vulgare* var. *nutans*), které patří mezi nejkvalitnější sladovnické ječmeny [48, 49].

Ječná obilka se skládá z obalu (pluchy, plušky, oplodí a osemení), zárodku (neboli embrya, klíčku) a endospermu. Endosperm tvoří největší část obilky a je hlavním zdrojem zásobních sacharidů (škrobu), bílkovin a dalších složek, nezbytných pro charakteristické vlastnosti sladu [48, 49].

Průměrné složení ječného zrna je 64 % škrobu, 10 % bílkovin, 2,5 % minerálních látek a zbytek je tvořen hemicelulosami, celulosou a lipidy. Z hlediska sladovnictví a pivovarství jsou nejdůležitějšími složkami ječmene sacharidy, dusíkaté látky a polyfenoly. **Sacharidy** sladu tvoří z největší části škrob, který je v konečném důsledku (po zcukření) klíčový pro

kvašení piva. Dále je zastoupena celulóza jako hlavní stavební složka pluchy a součást oplodí, osemení a klíčku. Hemicelulózy jsou stavebními složkami buněčných stěn, přičemž zejm. β -glukany jsou při výrobě piva nežádoucí, neboť snižují mobilizaci škrobu i proteinů endospermu a mají negativní vliv na technologii i kvalitu produktu. **Polyfenoly** (tríslovinné látky) jsou lokalizovány zejména v obalových částech zrna, důležité jsou mj. tanoidy a anthokyanogeny. Tyto sloučeniny se podílí na tvorbě organoleptických vlastností piva, především hořkosti a plnosti. Z **dusíkatých látek** sladu mají význam zejm. různé bílkoviny, konkrétně lepkové, zásobní, tkáňové, dále hormony a enzymy (amylasy, proteasy, fosfatasy aj.) [48, 49, 50].

Mezi nejdůležitější parametry sladu patří barva, vůně, chuť, moučnatost a **extraktivnost**, tj. souhrn všech látek sladu, které přejdou do roztoku při konvenční kongresní metodě zcukření. Dalším významným parametrem je **diastatická mohutnost**, která je ukazatelem β -amylasové aktivity, a **Kolbachovo číslo**, jež informuje o stupni proteolytického rozštěpení bílkovin [48, 50].

Existují různé typy sladů:

1. **Plzeňský (světlý) slad** (viz Obr. 3) je u nás nejčastější, světlý slad, charakteristický nízkou barvou.
2. **Dortmundský slad** je světlý slad, přizpůsobený velmi tvrdé vodě.
3. **Vídeňský slad** je světlý slad, typově mezi plzeňským a bavorským sladem, čímž tvoří přechod mezi světlými a tmavými slady.
4. **Bavorský (mnichovský) slad** je tmavý slad, charakteristický vysokou barvou a výraznějším aromatem, což je výsledkem hlubšího rozluštění (tj. rozštěpení vysokomolekulárních látek) v důsledku delšího klíčení s vyšším obsahem vody a při vyšší teplotě; za účelem podpory tvorby melanoidinů je při hvozdní dotahován při 105 °C.
5. **Speciální slady:**
 - a. **Karamelový slad** se používá při výrobě tmavých a speciálních piv. Je charakterizován vysokým obsahem cukrů, barevných a aromatických látek. Vyrábí se ze zeleného, popř. navlhčeného odklíčeného sladu v pražičích, kde probíhá pražení při teplotě 120–180 °C. Rozlišuje se karamelový slad světlý, polotmavý a tmavý (popř. ještě porterový) podle použité teploty.
 - b. **Barvicí slad** (viz Obr. 4) se používá při výrobě tmavých piv; vyrábí se z hotového sladu pražením v pražičích až při 220 °C.
 - c. **Melanoidinový slad** se používá při výrobě tmavých piv. Jeho tmavší barva a charakteristická chuť se nezískává zvýšenou teplotou jako u karamelových a barvicích sladů, nýbrž intenzivnějším průběhem karbonylaminových reakcí. Před nastíráním na hvozď se na vysoké hromadě nechá zapařit až na 50 °C, což zapříčiní hlubokou amyrolýzu a proteolýzu.
 - d. **Diastatický slad** je charakteristický svou vysokou diastatickou mohutností, tj. vysokou amylolytickou silou. Používají se při zpracování enzymově chudých sladů nebo při nahrazování sladů náhražkami bez enzymové aktivity. Sladování probíhá dlouho s vyšším obsahem vody za nízké teploty.

- e. **Proteolytický slad** se používá na úpravu kyselosti rmutů, pro zvýšení varného výtěžku, pěnovosti a trvanlivosti piva. Zelený slad je skrápěn kulturou bakterií *Lactobacillus delbrueckii* za účelem získání až 4 % kyseliny mléčné v hotovém sladu.
- f. **Pšeničný slad** se používá při výrobě speciálních, tzv. **bílých piv**. Průběh sladování má různá specifika v důsledku odlišného vstupního materiálu (např. zrna pšenice je bezpluché) [48, 49, 50, 52].



Obr. 3: Slad světlý [53]



Obr. 4: Slad barvicí (černý) [54]

Zvláštní skupinou sladových výrobků jsou **sladové výtažky**. Jedná se o zahuštěné výluhy ze sladu, které obsahují rozpustné extraktivní látky, získané procesem pivovarského rmutování. Výroba se skládá ze šrotování sladu, vyluhování sladu za varu a odpařování výluhů. Sladové výtažky se dělí na textilní, používané k enzymatickému rozkladu škrobu na

povrchu barvených tkanin, a potravinářské, které se dále dělí na jedlé, kanditní a pekařské [48].

Ječný slad lze při výrobě piva do určitého množství (daného Vyhláškou č. 248/2018 Sb.) nahradit **sladovými náhražkami (surogáty)**, a to škrobovými či cukernými [48].

3.2.3 Chmel

Další základní surovinou pro pivovarnictví je chmel, který pivu dává typickou hořkou chuť a přispívá k jeho charakteristickému aromatu. Kromě tohoto kořenícího významu má ale i další technologicky důležité vlastnosti, např. působí konzervačně [48, 49, 50]. V Česku se chmel pěstuje již od 9. století [50], na Moravě pochází první písemná zmínka o pěstování chmelu ze 13. století (Přerovsko) [47]. Dnes je pěstování chmelu kontrolováno a řízeno státem, přičemž jsou povoleny tři pěstitelské oblasti, tj. Žatecko a Úštěcko v Čechách a Tršicko na Moravě [48].

Chmel (rod *Humulus*) je dvoudomá rostlina z čeledi konopovitých (*Cannabaceae*), která roste v mírných podnebných podmínkách severní polokoule. Je náročná na světlo, teplo i vláhu. Existují tři druhy chmelu, z nichž pro pivovarství je nejdůležitější **chmel otáčivý** (*Humulus lupulus*), konkrétněji poddruh chmel evropský v různých odrůdách. Při výrobě piva se využívají samičí rostliny, které se skládají z kořenové soustavy, révy s pazochy a listy s osýpkami (květenství), jež se v průběhu zrání mění na hlávky (plodenství) [47]. **Chmelové hlávky** (viz Obr. 5) obsahují listeny, které při zrání vylučují pryskyřičná zrnka **lupulinu**, obsahující pro pivo cenné chmelové pryskyřice a silice [48, 49, 50].



Obr. 5: Chmelové hlávky [55]

V pivovarství jsou významné tři skupiny přírodních látek z chmelu. **Chmelové pryskyřice** jsou zdrojem hořké chuti piva; řadí se k nim α -hořké kyseliny (humulon, kohumulon, adhumulon), β -hořké kyseliny (lupulon, kolupulon, adlupulon), nespecifické měkké pryskyřice (humulinony, luputritiony) a tvrdé pryskyřice (humulinové a hulupinové

kyseliny). **Chmelové silice** zahrnují převážně terpenické látky (myrcen, humulen, karyofylen, farnesen), tvořící charakteristické aroma chmelu. **Polyfenoly chmelu** (chmelové třísloviny) jsou tvořeny pestrá skupinou sloučenin, mezi nimiž převažují flavonové glykosidy, anthokyanogeny, katechiny a volné fenolové kyseliny. Některé z těchto látek či jejich derivátů přispívají k hnědnutí mladiny, a tím i k barvě piva, jiné mají význam jako antioxidanty nebo dotvářejí hořkost a jiné senzorycké vlastnosti piva. Uplatňují se společně s polyfenoly sladu [48].

Chmel se ve světě pěstuje v mnoha různých odrůdách, z nichž jsou v České republice nejvýznamnější odrůdy **žateckého poloraného červeňáku**, např. Bor, Sládek či Preminant [48].

Rostliny chmelu se pěstují na **chmelnicích** a neoploďněné hlávky se sklízí tzv. **česáním** (dnes již strojně) v době zralosti, což je v našich podmínkách koncem srpna. Po sklizni bývá obsah vody v hlávkách až 82 %, teplovzdušným sušením se musí snížit na 8 %. Po sušení se chmel skladuje na půdách, následně se třídí, lisuje do žoků a odesílá do pivovarů, často se ale ještě dále upravuje na tzv. chmelové výrobky [48, 49].

Chmelové výrobky jsou z chmelu získávány různými metodami za účelem vyššího využití účinných složek nebo zabránění jejich oxidace. Rozlišují se:

1. chmelové výrobky připravené **mechanickými úpravami** hlávkového chmelu, které se svým charakterem nejvíce podobají neupravenému chmelu; řadí se k nim mleté chmely a granulované chmely (chmelové pelety);
2. chmelové výrobky připravené **fyzikálními úpravami** hlávkového chmelu, tzv. **chmelové extrakty** (ethanolové nebo CO₂), v současnosti široce rozšířené pro výrobu většiny piv;
3. chmelové výrobky připravené **chemickými úpravami** hlávkového chmelu, jejichž využití je však omezeno technologickými a legislativními požadavky [48, 49].

3.2.4 Pivovarské kvasnice

Klasické pivo je fermentovaný alkoholický nápoj, tedy alkohol v pivu vzniká v důsledku fermentace. Jedná se o **ethanolové kvašení** účinkem pivovarských kvasnic, produkujících ethanol z cukerných prekurzorů, které vznikly hydrolýzou škrobu obsaženého ve sladu [47].

Pivovarské (várečné) kvasnice jsou kvasinky určitých druhů z rodu *Saccharomyces*, taxonomicky řazené do domény *Eukarya*, říše *Fungi* (houby), třída *Ascomycetes* (vřeckovýtrusé), čeleď *Saccharomycetaceae*. Rozmnožují se vegetativně pučením, v nepříznivých podmínkách pohlavně sporami. Jejich metabolismus je v pivovarství významný především z hlediska fermentace zkvasitelných cukrů, ale také v souvislosti s dalšími složkami mladiny, v jejichž přítomnosti kvasinky produkují nejrozličnější metabolity, ovlivňující charakter piva. Obecně lze říci, že metabolismus kvasinek závisí od složení mladiny, vlastností použitých mikroorganismů a podmínek procesu [48].

Existují pivovarské kvasinky dvojího typu:

1. **Svrchní pivovarské kvasinky** (*Saccharomyces cerevisiae*) jsou využívány k výrobě svrchně kvašených piv, ve kterých jsou na konci kvašení kvasinky vynášeny bublinkami oxidu uhličitého ke hladině [48]. Historie vaření piva je spojena výhradně se svrchním kvašením až do poloviny 19. století, kdy vznikla chladič zařízení [48, 51].

2. **Spodní pivovarské kvasinky** (*Saccharomyces pastorianus* neboli *S. carlsbergensis*) jsou používány k výrobě spodně kvašených pív, kde na konci kvašení kvasinky sedimentují na dně kvasných nádob [48]. Spodní kvasinky vznikly hybridizací druhu *S. cerevisiae* (svrchní kvasinky) a druhu *S. eubayanus*, adaptovaného na nízké teploty [56, 57].

Hlavní rozdíly mezi svrchními a spodními kvasinkami jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7: Porovnání některých znaků pivovarských kvasinek svrchních a spodních [48, 49]

	Svrchní kvasinky	Spodní kvasinky
Složení buněčné stěny	na konci kvašení jsou kvasinky bublinkami oxidu uhličitého vynášeny na hladinu	na konci kvašení kvasinky sedimentují ke dnu
Zkvašování rafinosy	cca z jedné třetiny	úplně
Schopnost sporulace	vyšší	nižší
Zákvasná teplota	15–18 °C	6–12 °C
Maximální teplota kvašení	25–28 °C	9–16 °C
Senzoricky významné vedlejší produkty kvašení	větší množství	menší množství

V době, kdy ještě nebyla známa existence mikroorganismů (do poloviny 19. století), byla zdrojem kvasnic hmota sebraná z povrchu nebo sedimentovaná na dno, která byla mezi várkami pečlivě uchovávaná pod směsí bylinného extraktu v keramických nádobách [47]. Dnes bývá zdrojem kvasinek buď provozní kvasící mladina, nebo banka kvasničných kmenů [48].

3.3 Technologie výroby piva

Pivovarství se řadí k potravinářským biotechnologiím s historií několika tisíciletí. Pro vaření je však zapotřebí nejprve vyrobit jednu z hlavních surovin, tj. slad, v procesu **sladování**. V České republice patří **sladařství** mezi nejtradičnější potravinářské odvětví a slad je společně s chmelem a pivem naší velmi úspěšnou vývozní komoditou [49].

Samotná výroba piva se skládá ze tří úseků:

1. **výroba mladiny**, jejímž cílem je převést do roztoku extraktivní látky sladu a chmelu v optimální míře i složení a zabezpečit dostatek živin pro metabolismus kvasinek [50]; převážná část výroby mladiny (od vystírání po chmelovar) probíhá na tzv. **varně**;
2. **hlavní kvašení a dokvašování**, tj. přeměna sacharidů na alkohol a oxid uhličitý za současného vytváření vhodných organoleptických vlastností piva;
3. **závěrečné úpravy piva** [49].

3.3.1 Šrotování sladu

Výroba mladiny, první z úseků samotného vaření piva, začíná příjmem sladu a jeho šrotováním. Cílem **šrotování** je rozdrcení sladu a dobré vymletí endospermu, ze kterého se

získává základní podíl extraktu mladiny. Jedná se o čistě mechanický proces, probíhající ve **šrotovnicích**; výsledkem je **sladový šrot** [48, 50].

V souvislosti se šrotováním je dobré zmínit pojem **sypaní**, tj. rozpis surovin, které vnášejí do várky extrakt, čímž určují její objem a koncentraci. Je to množství sladů, sladových surogátů a pomocných látek (např. cukrových kulérů, prostředků upravujících pH či enzymatických preparátů), které se použijí na jednu várku [48, 50].

3.3.2 Vystírání

Vystírání je dokonalé smísení sladového šrotu s vodou, při některých technologických postupech je spojené se **zapařováním**. Tento proces se odehrává ve **vystírací pánvi**; produktem je **vystírka**. **Nálevem** na várku se rozumí celkové množství vystírací a zapařovací vody pro dané sypaní. Poměr sypaní a nálevu se volí tak, aby sacharizace předku byla cca 13 až 18 % hm.; liší se u světlých a tmavých piv [48, 50].

Důležitým faktorem je teplota vystírky. Při dvourmutovém postupu má vystírací voda 37 °C a zapařuje se vodou o teplotě alespoň 85 °C. Pro dobré promíchání šrotu s vodou se provádí míchání [48, 50].

3.3.3 Rmutování

Cílem **rmutování** je převedení optimálního podílu extraktu surovin do roztoku. Pouze menší část sladového extraktu je přímo rozpustná, zbytek je proto nutné převést do rozpustné formy působením sladových enzymů, především amylas, proteas a kyselinotvorných enzymů [49]. Rmutování probíhá ve **vystírací a rmutovací pánvi**; výsledkem je tzv. **sladové dílo** [48].

Základním požadavkem je převést veškerý škrob do roztoku, což je umožněno jeho štěpením účinkem amylolytických enzymů, zejm. α -amylasy a β -amylasy. Škrob je degradován na zkvasitelné cukry (glukosu, maltosu, maltotriosu) a nezksavitelné dextriny v procesech bobtnání a mazovatění, ztekucení a zcukření. Působením proteolytických enzymů dochází ke zvýšení celkového množství rozpustného dusíku, a to má pro výsledný produkt velký význam, jelikož štěpné produkty bílkovin sladu hrají zásadní roli např. v pěnivosti či plnosti chuti piva. Přirozená kyselost sladiny je způsobena jednak disociací vzniklých aminokyselin, avšak obzvláště štěpením organických fosfátů vlivem kyselých fosfatas [49].

Průběh rmutování a složení sladiny ovlivňuje zejména volba teplot a doba působení, odpovídající jednotlivým enzymům či enzymovým skupinám sladu. Pro posílení nebo potlačení působení daných enzymů lze během rmutování manipulovat s časovými prodlevami při teplotě jejich teplotních optim. Obecně se rozlišují dva základní způsoby rmutování, tj. **rmutování infuzní** a **dekokční** [49, 50].

3.3.4 Scezování

Sladové dílo, vzniklé rmutováním, je v procesu **scezování** rozděleno na **sladinu**, tj. vodný roztok extraktivních látek, a **mláto**. Sladové mláto je pevný podíl, tvořený zbytky endospermu, pluchami a zachycenými vločkami látek vysrážených při rmutování; lze jej využít jako krmivo [48, 49].

Proces scezování probíhá ve dvou krocích. Nejprve se oddělí tzv. **předek** a potom následuje **vyslazování**. Jedná se o promývání mláta horkou vodou (75–78 °C) za vzniku

zředěných roztoků sladiny, zvaných **výstřelky**. Vyslazování mláta se provádí zpravidla dvakrát až třikrát, přičemž obsah extraktu ve výstřelcích klesá. Předek se s výstřelky shromažďuje ve sběrači sladiny nebo v mladinové pánvi [49].

Ke scezování tradičně slouží **scezovací kád'**, vybavená dvojitým dnem. Horní (jalové) dno je děrované a usazuje se na něm vrstva mláta, která vykazuje filtrační účinek. Ke spodnímu (pravému) dnu je připojen systém odvádějící sladinu. Jiným zařízením používaným ke scezování je **sladinový filtr** [49].

3.3.5 Chmelovar

V procesu **chmelovaru** se slatina vaří s chmelem v **mladinové pánvi** za vzniku **mladiny**. Během chmelovaru probíhá několik významných fyzikálně-chemických pochodů:

- odpaření přebytečné vody (přebytek vzniká vyslazováním);
- sterilizace mladiny;
- inaktivace zbylých enzymů;
- tvorba barevných a redukujících látek (především melanoidinů, ale i polyfenolů aj.), která je spojena s poklesem pH;
- koagulace bílkovin a tvorba tzv. **lomu mladiny** (hrubého kalu), což je označení pro velké shluky vloček denaturovaných a koagulovaných vysokomolekulárních bílkovin; přitom dochází k číření mladiny;
- extrakce účinných látek chmelu do mladiny a jejich chemické reakce, zvláště extrakce α -hořkých kyselin a jejich intramolekulární izomerizace na iso- α -hořké kyseliny;
- odstranění dimethylsulfidu (DMS) vytěkáním a jeho prekurzorů (*S*-methylmethionin) štěpením při vyšších teplotách; DMS totiž uděluje pivu nepříjemnou mladinovou až zeleninovou příchut' [48, 49].

3.3.6 Chlazení a separace kalů

Po chmelovaru následuje tzv. **mladinová linka**, která má za úkol separovat z mladiny hrubé kaly, ochladit mladinu na zákvasnou teplotu (liší se u svrchního a spodního kvašení) a separovat jemné kaly tak, aby byla mladina připravena k zakvašování. Chlazení je kritický proces, neboť ochlazovaná mladina je náchylná ke kontaminaci (zejm. při teplotách mezi 40 a 60 °C). Je třeba mladinu před kontaminací chránit, u moderních chladicích zařízení se proto provádí jejich čištění a sanitace. Při použití stoků nebo usazovacích kádí se mladina dochlazovala z 50–60 °C na sprchových chladičích, dnes dochází k ochlazování mladiny z vířivé kádě z teplot až 97 °C pomocí deskových chladičů [48, 50].

3.3.7 Kvašení

Cílem **kvašení** je především přeměna zkvasitelných cukrů na ethanol a oxid uhličitý, avšak také tvorba některých dalších senzorycky účinných látek [48]. Podle použitých kvasnic se rozlišuje **kvašení svrchní** a **spodní**, které poskytují různé produkty (svrchně a spodně kvašená piva). Důležité rozdíly mezi svrchními a spodními kvasinkami jsou uvedeny v Tab. 7. Technologicky významné jsou zejm. jejich různé provozní teploty při kvašení (svrchní kvasnice obvykle 18–24 °C, spodní kvasnice 6–12 °C), jimž musí odpovídat předchozí krok chlazení mladiny [49].

Kvasničná biomasa se získává pomocí **laboratorní** a **provozní propagace**, během které se buňky pomnožují v postupně se zvětšujících objemech, a sice nejprve ve sterilní sladně (laboratorní propagace), potom ve sterilní mladině (provozní propagace). Inokulace kvasinek do mladiny (cca $1,5 \cdot 10^7$ buněk/ml) se nazývá **zakvašování** a u spodních kvasnic probíhá při teplotách v rozmezí 6–12 °C. Zchlazená mladina je přitom provzdušňována sterilním vzduchem, aby byl optimálně nastartován metabolismus kvasinek [48].

Spodní kvašení mladiny se uskutečňuje ve dvou fázích. **Hlavní kvašení** mladiny probíhá tradičně v otevřených kádích, umístěných ve větraných a chlazených místnostech, tzv. **spilkách**. Celková doba hlavního kvašení je obvykle 6 až 10 dní v závislosti na hodnotě extraktu původní mladiny; výsledkem je **mladé pivo**. Podle vzhledu povrchu kvasící mladiny lze rozlišit několik stádií hlavního kvašení:

1. zaprašování a odrážení (po 12–24 h od zakvašení, objevuje se bílá pěna),
2. nízké bílé kroužky (po 24–36 h, hustá bílá pěna, nejintenzivnější kvašení),
3. vysoké hnědé kroužky (po 3–4 dnech, pěna se barví kvůli kalům),
4. propadání deky (snižování výšky pěny, sedimentace kvasnic spodního kvašení).

Tmavá vrstva pěny (**deka**) se z hladiny sbírá, následně se odčerpá mladé pivo a sedimentované kvasinky lze proprat studenou vodou a opakovaně (optimálně 3 až 4krát) použít [49].

Druhou fází kvašení je **dokvašování (ležení)** mladého piva, což se děje v uzavřených ležáckých nádobách, konkrétně ve starších **ležáckých sudech** či modernějších **ležáckých tancích**, které jsou umístěny v **ležáckých sklepech** (při teplotě –2 až 3 °C). V uzavřených nádobách vzniká kvašením oxid uhličitý a pod tlakem sytí kapalinu. Celková doba dokvašování se různí od 1 až po 10 týdnů podle typu piva a koncentraci mladiny. Výsledkem po dokvašování je již hotové **pivo**, jež se pak někdy dále upravuje [49].

Výše byla popsána technologie spodního kvašení. Svrchní kvašení probíhá obdobným postupem, avšak vyznačuje se některými důležitými rozdíly. Zákvasná teplota svrchních kvasnic je vyšší (15–18 °C, popř. i vyšší), celé kvašení probíhá při vyšších teplotách (až 28 °C). Celková doba fermentace je 5 dní a na jejím konci se na hladině kvasící mladiny tvoří vrstva kvasnic [48].

Hlavními produkty kvašení mladiny (a dokvašování mladého piva) jsou ethanol a oxid uhličitý, které vznikají anaerobní fermentací glukosy podle Embden-Meyerhofovy dráhy. Kromě toho se však tvoří i některé vedlejší produkty jako vyšší alkoholy, estery, aldehydy, vicinální diketony (2,3-butandion a 2,3-pentadion), dimethylsulfid, volné mastné kyseliny, další organické kyseliny atd. Vedlejší produkty jsou tvořeny ve větší míře při svrchním kvašení [49].

3.3.8 Závěrečné úpravy piva

Pivo je po dokvašování již z organoleptického hlediska považováno za hotové, lze jej podávat přímo z ležáckých sudů či tanků, avšak často se ještě dále upravuje. K závěrečným úpravám piva patří **filtrace**, **stabilizace**, **stáčení** a **pasterace**. Tyto procesy se provádějí za účelem vyhovění spotřebitelským a komerčním požadavkům na vzhled, trvanlivost a obchodovatelnost hotového piva [49].

3.4 Chemické složení a parametry piva

Hotové pivo je disperzní soustavou mnoha chemických sloučenin, včetně biomakromolekul ve formě koloidního roztoku. Konkrétní chemické složení se podstatně různí podle typu piva, ale i v rámci jednoho typu v důsledku kolísání podmínek mezi jednotlivými várkami. Některé látky pocházejí už z výchozích surovin, avšak většina je výsledkem chemických a biochemických reakcí v průběhu výroby piva [48].

Z anorganických sloučenin je nejvíce zastoupena **voda** (88–96 %) a důležitý je také **oxid uhličitý** (0,35–0,55 % hm.), způsobující říz piva. Z těkavých složek je nejvýznačnější **ethanol** (obsah závisí na extraktu původní mladiny a stupni prokvašení), jenž se podílí na plnosti piva. Pro senzorické vlastnosti jsou z těkavých složek nejpodstatnější **estery** (10–30 mg/l). V závislosti na extraktu původní mladiny obsahuje pivo 2–6 % extraktivních látek. Hlavní součástí extraktu jsou **sacharidy**, zvláště dextriny a dále maltosa, maltotriosa aj. Zbytek tvoří **dusíkaté látky**, ovlivňující plnost a pěnivost, **polyfenoly**, udělující pivu trpkou, svíravou chuť, **hořké látky chmele** a **barviva**. Pivo je také zdrojem některých **vitaminů**, především řady B [48].

Základními vlastnostmi piva jsou jeho čirost (průzračnost), barva, hořkost, pěnivost, redoxní vlastnosti, pH a především extrakt původní mladiny [48].

Extrakt původní mladiny (EPM, dříve stupňovitost) P je definován jako obsah rozpuštěných látek (extraktivnost) původní mladiny a udává se v hmotnostních procentech (% hm.). S veličinou EPM souvisí také **extrakt zdánlivý** E_z , tj. extraktivnost piva zbaveného oxidu uhličitého, a **extrakt skutečný** E_s , tj. extraktivnost piva zbaveného oxidu uhličitého a alkoholu doplněného vodou na původní hmotnost. Kromě toho se většinou uvádí také **alkohol** A , čili obsah alkoholu v % obj. Mezi těmito veličinami platí určité vztahy, označované jako **Ballingovy vzorce**, které jsou uvedeny v rovnicích (1) a (2), kde K je konstanta, kterou lze nalézt v pivovarských tabulkách, a q je koeficient atenuace, související se zředěním v důsledku různých hustot vody a ethanolu [48].

$$P = 2A + E_s + K \quad (1)$$

$$P = (E_s - E_z) \cdot q^{-1} + E_s \quad (2)$$

Hodnoty pH piv se pohybují mezi 4,3 a 4,7. Pakliže se pH odchyluje od tohoto intervalu, obvykle to ukazuje na vadu piva. pH piva se měří skleněnou elektrodou [48].

Ke kvantifikaci **hořkosti piva** se používá jednotek IBU (*International Bitterness Units*), kdy 1 IBU je přibližně ekvivalentní 1 mg/l isohumulonu jako hlavní hořké látky z chmelu [43]. Jinou jednotkou je EBU (*European Bitterness Unit*), které se počítají z absorbance „isosloučenin“ po vytřepání do isooktanu [58].

Barva piva se určuje v jednotkách EBC (*European Brewery Convention*), u světlých piv se pohybuje v rozmezí 8–12 EBC, u polotmavých piv 20–40 EBC a u tmavých 60–120 EBC. Barva se měří spektrofotometricky při 430 nm nebo subjektivní vizuální komparací se standardy [48].

3.5 Druhy pív

Základní klasifikace pív na základě dvou aspektů:

- a. Podle typu kvašení (podle použitého druhu kvasinek):
 1. **svrchně kvašená piva**, vyrobená za použití svrchních kvasinek,
 2. **spodně kvašená piva**, vyrobená za použití spodních kvasinek.
- b. Podle barvy:
 1. **světlá piva**, vyrobená převážně ze světlých sladů,
 2. **polotmavá a tmavá piva** z tmavých, karamelových či barvicích sladů v kombinaci se slady světlými;
 3. **řezaná piva** se vyrábí při stáčení smísením světlých a tmavých pív [46, 48].

Podle Vyhlášky č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí, se v závislosti na hodnotě EPM rozlišují:

- **stolní pivo** (EPM do 6 % hm. včetně),
- **výčepní pivo** (EPM 7–10 % hm.),
- **ležák** (spodně kvašené pivo s EPM 11–12 % hm.),
- **plné pivo** (svrchně kvašené pivo s EPM 11–12 % hm.),
- **silné pivo** (EPM 13 % hm. a vyšší).

Piva s nízkým obsahem alkoholu se dělí na **nízkoalkoholická piva** (0,5–1,2 % obj.) a **nealkoholická piva** (nejvýše 0,5 % obj.) [46].

3.6 Pivní styly

Pivním stylem (neboli **pivním typem**) se podle zmíněné Vyhlášky č. 248/2018 Sb. rozumí „označení obvyklého způsobu produkce a surovinového složení podle postupů provozovaných v tradičních oblastech výroby v souladu s očekáváním spotřebitele“ [46].

3.6.1 Ale

Ale je v širším smyslu název pro všechny svrchně kvašená piva, častěji se však používá v užším významu jako označení vybraných svrchně kvašených pív britského typu, původem z Anglie a Irska [48, 51, 59]. K pivům typu *ale* lze řadit níže popsané pivní styly.

English Pale Ale je anglický styl lehčích, světlých, svrchně kvašených pív. Existují dva základní podtypy: **Standard/Ordinary Bitter** (lehké pivo o nízkém extraktu a nízkém alkoholu) a **Extra Special/Strong Bitter** (střední až středně silné, poněkud hořčí pivo) [59].

English Brown Ale jsou anglická polotmavá piva. Známým typem je **Mild**, které má nižší extrakt a nízkou hořkost a je často podáváno jako točené v britských hospodách. Dále se sem řadí **Southern English Brown**, sladší pivo s karamelovou chutí, a **Northern English Brown**, které je sušší a o něco hořčí [59].

American Ale je americký styl svrchně kvašených pív. Lze rozlišit tři podtypy: **American Pale Ale**, což je světlé, osvěžující pivo s chmelovou chutí; **American Amber Ale**, jež má výraznější (jantarovou) barvu a karamelovější chuť; **American Brown Ale**, styl tmavší a kořeněnější [59].

India Pale Ale (IPA) je styl hořkých, silně chmelených, světlých pív. **English IPA** je původní typ IPA, středně silné pivo, historicky určené pro lodní převoz z Anglie do Indie.

Aby se nezkažilo v průběhu cesty, bylo konzervováno silným chmelením. **American IPA** je americká verze IPA, středně silné a hořké pivo. **Imperial IPA** je intenzivně hořká a velmi silná varianta IPA [59].

Scotch Ale je skotský styl piv s výraznou sladovou příchutí. Chuť bývá plná, zakulacená, barva většinou dosti tmavá. Některá piva typu skotského *ale* jsou belgické produkty [51].

Belgická a francouzská piva typu ale jsou rozmanitou skupinou pivních stylů. K nejznámějším patří **Belgian Pale Ale**, středně silné, polotmavé pivo měděné barvy s ovocnou chutí. Z tradičních belgických piv lze zmínit **Witbier**, středně silné, světlé pšeničné pivo, které se připravuje kombinací přibližně stejných množství ječného sladu a nesladované pšenice. Tradiční valonské pivo **Saison** je středně silné až silné s charakteristickou žlutooranžovou barvou a kyselou chutí, které se dosahuje použitím okyselených sladů nebo přidáním kultury laktobacilů. Těžké, světlé vlámské pivo **Duvel** (vlámsky čert, ďábel) je silně alkoholické s ráznou chmelovou hořkostí. Belgickou specialitou je **Vlámské hnědé pivo**, které zraje alespoň jeden rok v dubovém dřevě a následně se řeže s mladým pivem; díky dubovému dřevu má lehce sladkokyselou příchut'. Znáмым belgickým klášterním pivem je **Trapista**, připravovaný striktně mnichy Řádu cisterciáků přísné observance (trapisty) za zdmi trapistických klášterů. Kromě zmíněných piv se v Belgii a Francii připravuje také mnoho speciálních typů piv, která jsou svrchně kvašená, avšak nelze je zařadit k jednomu stylu [51, 59].

Německá svrchně kvašená piva jsou poměrně širokou skupinou stylů, mezi nimiž zaujímají významné postavení **piva bílá**, tzn. **pšeničná**. Patří k nim **Weizenbier** (také **Weissbier** nebo jen **Weisse**), světlé pšeničné pivo s kořeněnou, ovocnou chutí, a **Dunkelweizen**, polotmavé pšeničné pivo. Na rozdíl od belgického Witbier se německá pšeničná piva vaří z pšeničného sladu [59]. Ze svrchně kvašených ječných piv je známý **Alt** (také **Altbier**), většinou tmavější, ale někdy i světlé, jemné, lehce nahořklé pivo, které se koncentruje v německém Düsseldorfu. Svrchně kvašeným německým pivem z Kolína nad Rýnem (německy Köln) je **Kölsch**, světlý, lehký a jemný se silným obsahem oxidu uhličitého [51].

Sour Ale (česky zvané **kyseláče** [60]) jsou skupinou pivních stylů, pro něž je charakteristická kyselá chuť. Řadí se k nim berlínská regionální specialita **Berliner Weisse**, velmi světlé, kyselé, osvěžující, nízkoalkoholické pšeničné pivo. Při jeho přípravě probíhá symbiotická fermentace svrchních kvasinek a bakterií *Lactobacillus delbrueckii*, které zde produkují kyselinu mléčnou. Dalšími příklady jsou vlámská tradiční kyselá piva **Flanders Red Ale** (ze Západních Flander) a **Flanders Brown Ale** (neboli **Oud Bruin** z Východních Flander). Jedná se o produkty často připravované mísením starších a mladších piv, fermentované směsnou kulturou kvasinek *Saccharomyces* a *Brettanomyces* a bakterií *Lactobacillus* (a *Acetobacter*), takže při kvašení vzniká vedle ethanolu také kyselina mléčná [59]. K typu Sour Ale lze řadit také některá **spontánně kvašená piva**. Mezi nejznámější patří belgické tradiční pivo **Lambiek** a piva z něj připravená řezáním a zráním, zvaná **Geuze**, nebo slazením, zvaná **Faro** [51].

3.6.2 Porter

Porter je tmavé, svrchně kvašené pivo výrazné chuti, s vysokým obsahem alkoholu a silně chmelené, které vzniklo v Londýně [48]. Má specifickou chuť po pražení a připravuje se s využitím tmavých a zejm. speciálních sladů, konkrétně karamelových či barvicích (čokoládových a černých) [59]. Lze rozlišit dvě varianty:

Brown Porter vznikl z původní anglické varianty. Má mírnější chuť po pražení a obvykle neobsahuje černé slady nebo pražený ječmen [59].

Robust Porter je buď historická verze Brown Porteru, nebo jeho americká interpretace; je možno se setkat s oběma verzemi. Robust Porter je více chmelený a často se při jeho vaření používá černých sladů nebo se přidává pražený ječmen. Výsledná chuť je komplexnější, příchut' praženého sladu je výraznější [59].

3.6.3 Stout

Stout je velmi tmavé (téměř černé), hutné, svrchně kvašené pivo, které vzniklo původně jako silná, plnější a krémovější varianta porteru (originální název zněl *Stout Porter*). Často se podává nechladené [48, 59]. Rozlišují se dvě varianty:

Dry Stout je velmi tmavé, hořké, krémové pivo s příchutí praženého sladu. Jeho specifická chuť pochází od praženého nesladovaného ječmene, který se při výrobě přidává ke světlému sladu. Dry Stout může být mírně až silně chmelené, někdy se v malé míře míchá s kyselým pivem, aby se dosáhlo komplexnější chuti (např. piva Guinness) [59].

Sweet Stout je také velmi tmavé, avšak spíše sladké, plné pivo s mírnou příchutí praženého sladu. Chuť často připomíná slazené *espresso*, kdy sladkost je způsobena menší mírou chmelení a vysokým obsahem dextrinů. Jedná se o anglický styl, tradičně nazývaný také *Milk Stout* nebo *Cream Stout* [59].

3.6.4 Lager

Lager (česky **ležák**) je označení pro spodně kvašená piva, mezi která se řadí níže popsané styly.

Pilsner (Pilsener, Pils, tzv. pivo plzeňského typu) je tradiční české spodně kvašené pivo, které bylo poprvé uvařeno v Plzni (odtud název) v roce 1842. Je vždy světlé s lehkou chutí světlého (plzeňského) sladu a výraznou hořkostí po chmelu. Obsah alkoholu leží mezi 4,5 a 5,5 %. Lze rozlišit tradiční **plzeňské pivo českého stylu (Bohemian Pilsner)**, **německého stylu (German Pilsner)**, popř. dalších stylů [51, 59].

Dortmunder je podobně jako Pilsner světlý ležák, odlišuje se od něj o něco plnější barvou, menším podílem chmele a jemnější, plnější chutí. Často se také nazývá *Dortmunder Export* [51].

Amber Lager (polotmavý ležák) je polotmavé spodně kvašené pivo. Původním stylem je **Vídeňský ležák** jantarové až měděné barvy, pro jehož výrobu se používá vídeňský a/nebo mnichovský slad. Poněkud aromatictější polotmavým ležákem je **březňák (Märzen, příp. také Oktoberfest)**, který se historicky vařil na jaře na konci pivovarnické sezóny, přes léto se nechal ležet a podával se na podzim při tradičních oslavách [59].

Dark Lager (tmavý ležák) je skupina tmavých spodně kvašených piv. Řadí se sem **Dunkel**, tmavé mnichovské pivo, bohaté se sladkostí mnichovského sladu, a **Schwarzbier**

(*černé pivo*), o něco tmavější regionální specialita z oblastí jižního Durynska a severních Frank [59].

Bock je silné pivo s vyšším alkoholem, původem z německého Einbecku. Tradiční bock je sladší, lehce chmelený. Existují ale i různé další styly, např. původně klášterní, silnější *Doppelbock* (*dvojitý bock*) nebo mladší, hořčí *Maibock* (*májový bock*) čili *Helles*, spjatý s jarem a květnovými oslavami [59].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a vybavení

- předvážky: Ohaus CS200, Ohaus, Švýcarsko
- vortex: Vortex V-1 plus, Biosan, Lotyšsko
- ultrazvuková lázeň: PS 02000, Notus – Powersonic, Slovensko
- laminární box: ESCO Airstream® Class II BSC, Esco Micro, Singapur
- hlubokomrazicí box: ULUF 490, Arcitko, Dánsko
- termostat: INCU-Line IL 53, VWR, USA
- mikroskop: LM 666 PC/∞, Intraco Micro, Česko
- centrifugy:
 - Boeco U-32R, Boeco, Německo
 - Hermle Z 36 HK, Hermle, Německo
- pH metr: Hanna pH 211, Hanna Instruments, Česko
- spektrofotometr: NanoPhotometer™, Implen, Německo
- absorbanční ELISA reader: ELx808, BioTek, USA
- průtokový cytometr: Apogee A50, Apogee Flow Systems, Spojené království
- sestava pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC):
 - kapalinový chromatograf: Dionex UltiMate 3 000 Series, Thermo Fisher Scientific, USA
 - kolona: Rezex ROA-Organic Acid H⁺; rozměry 300 × 7,8 mm; velikost částic 8 μm, Phenomenex, USA
 - termostat kolony: Column Oven LCO 101, ECOM, Česko
 - refraktometrický (RI) detektor: ERC RefractoMax 520, DataApex, Česko
- varné nádoby: Bielmeyer pivní systém BHG 403 Set, Bielmeyer Hausgeräte, Česko
- kbelíky potravinářské plastové, EZ 500 EB, s víkem 101, Florian, Česko
- polyethylentereftalátové (PET) lahve: Nr 35, 330ml (hnědé), s uzávěry nápojovými 021, BEMA Lanškroun, Česko
- topná deska: CERAN 500/44A, Harry Gestigkeit, Německo
- chladičí smyčka nerezová
- teploměr: testo 112 V1.18, Testo, Německo
- refraktometr
- běžné laboratorní vybavení

4.2 Použitý software

- DinoCapture 2.0, Dino-Lite, Taiwan
- Gen5 Software 1.11, BioTek, USA
- Histogram Software v255.0.0.74, Apogee Flow Systems, Spojené království
- Chameleon 7, Thermo Fisher Scientific, USA

4.3 Použité chemikálie a jiný materiál

- MRS médium: Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth), Himedia, Indie
- agar: Agar powder, Bacteriological, Himedia, Indie
- methylenová modř: Methylene blue, E-Merck, Německo
- propidiumjodid: Propidium Iodide, eBioscience, Thermo Fisher Scientific, USA
- glycerol: Glycerin bezvodý p.a., Lach-Ner, Česko
- ethanol: Ethanol 96% p.a., Lach-Ner, Česko
- kyselina sírová: Kyselina sírová 96 % p.a., Merci, Česko
- Carrezova činidla I a II: roztoky síranu zinečnatého a hexakynoželeznatanu draselného
- sladové výtažky: Pale Ale, Sladovna Bruntál, Česko
- chmelový výrobek: pelety chmelu Sládek (KH 8,08 %), Česko
- Milli-Q voda
- destilovaná voda
- kohoutková voda

4.4 Použité kmeny mikroorganismů

V experimentální části této práce byly použity zakoupené kultury probiotických bakterií následujících druhů (v závorkách za taxonomickým pojmenováním bakterie jsou uvedeny čísla šarží):

- *Lactobacillus acidophilus* (180316LA-1),
- *Bifidobacterium breve* (180320BB),
- *Bifidobacterium bifidum* (180320BBI).

Dále byly použity kvasinky pro svrchní kvašení piva, tj. *Saccharomyces cerevisiae*, které byly zakoupeny pod obchodním názvem Safale S-04 (kvasnice sušené, svrchní) od výrobce Fermentis, země původu Francie.

4.5 Použité reálné vzorky pív

V práci bylo také použito několik reálných vzorků pív, jejichž výčet a charakteristiku uvádí Tab. 8.

Tab. 8: Reálné vzorky pív a jejich specifikace

Značka (zkratka)	Výrobce	druh piva	alkohol [% obj.]
Pilsner Urquel (P)	Plzeňský Prazdroj	ležák	4,4
Radegast Rázná 10 (R)		výčepní p.	4,1
Birell Světlý (B)		nealko. p.	≤ 0,5
Staropramen Ležák (S12)	Pivovar Staropramen	ležák	5,0
Staropramen Smíchov (S10)		výčepní p.	4,0
Staropramen Nealko (SN)		nealko. p.	≤ 0,5
Bernard Dvanáctka (B12)	Rodinný pivovar BERNARD	ležák	4,9
Bernard Desítka (B10)		výčepní p.	3,8
Bernard s čistou hlavou Free (BN)		nealko. p.	≤ 0,5

Ve všech případech se jedná o světlé, spodně kvašené pivo plzeňského (českého) typu. Od každého výrobce byly zvoleny vždy tři druhy piva dle Vyhlášky č. 248/2018 Sb., tj. ležák, výčepní pivo a nealkoholické pivo. V Tab. 8 je také u každého vzorku piva zmíněn obsah alkoholu v objemových procentech tak, jak je uveden na etiketě daného produktu. Všechna piva jsou filtrována a pasterizována s výjimkou piv od výrobce Rodinný pivovar BERNARD, od kterého jsou všechny tři použité vzorky piv nepasterizovány.

4.6 Kultivace probiotických bakterií v tekutém médiu

Probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium bifidum* byly kultivovány v komerčním médiu Lactobacillus MRS Broth. Tekuté médium bylo připravováno podle návodu na etiketě, tj. rozpuštěním v destilované vodě v poměru 55,15 g média na 1 000 ml vody. Připravený roztok byl sterilován v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem při teplotě 100 °C po dobu 45 minut. Kultury probiotických bakterií byly očkované do tekutého média v plastových zkumavkách různého objemu, přičemž práce byla prováděna ve sterilním laminárním boxu.

Nejprve proběhla inokulace z lyofilizátů za účelem vytvoření zásoby zmrazených kultur v kryozkumavkách. Do 50 ml média bylo naváženo 0,1 g lyofilizovaných bakterií, které byly následně kultivovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Ze vzniklé kultury bylo pipetováno po 1 ml do kryozkumavek, vždy smíseno s 0,5 ml 30% glycerolu a uloženo do hlubokomrazicího boxu při teplotě –80 °C. Tímto způsobem byly připraveny zmrazené kultury probiotických bakterií všech kmenů.

Následné experimenty byly prováděny s inokuly, které byly připravovány vždy následovně: 1 ml zmrazené kultury z kryozkumavky bylo smíseno s 15 ml, resp. 50 ml tekutého média v 15ml, resp. 50ml plastové zkumavce a kultura byla kultivována v termostatu při 37 °C. Zkumavky byly vždy plněny zcela, aby byl omezen přístup kyslíku k bakteriální kultuře a aby tak byly splňovány anaerobní podmínky kultivace. Doba kultivace při přípravě inokula se lišila u jednotlivých kmenů probiotik i u prováděných experimentů (viz dále).

4.7 Optimalizace stanovení počtu a viability buněk probiotických bakterií

V rámci této práce byly počet a viabilita buněk stanovovány několika různými způsoby. Nejprve byla posouzena aplikovatelnost jednotlivých metod pro stanovení zmíněných parametrů a následně byly vybrané metody použity v ostatních částech experimentální části pro sběr dat. Výsledky získané použitými metodami byly mezi sebou porovnány za účelem nalezení optimální metody za daných podmínek.

4.7.1 Přímé stanovení mikroskopickou metodou

Kultura mikroorganismů byla vhodně desítkově ředěna destilovanou vodou na výsledné zředění 10^6 a následně nanesena na obě mřížky Bürkerovy komůrky. Komůrka byla přikryta krycím sklíčkem a vložena pod optický mikroskop, kde byly buňky pozorovány při celkovém zvětšení 640×. V obou mřížkách komůrky byla vybrána oblast, ve které byl stanovován počet buněk probiotických bakterií. Počítání probíhalo v různých polích (malých či velkých čtvercích, popř. v obdélnících) o objemu V , přičemž typ polí byl vybrán podle koncentrace

buněk ve vzorku tak, aby se počty buněk v polích pohybovaly v rozmezí 8–12. Byl stanoven počet buněk vždy v 10 polích ve zvolených oblastech mřížek a z výsledků byl vypočten aritmetický průměr B . Počet buněk v 1 ml kultury X byl u jednotlivých vzorků stanoven podle rovnice (3).

$$X = 1\,000 \cdot Z \cdot V^{-1} \cdot B \quad (3)$$

Pro stanovení viability byla ke zředěné kultuře mikroorganismů nanášena kapka roztoku methylenové modři, sestávajícího z 0,3 g methylenové modři, 30 ml 96% ethanolu a 100 ml destilované vody. Pod mikroskopem byly počítány modře zbarvené, tj. mrtvé buňky podobně, jako je popsáno výše, a byl vypočten počet mrtvých buněk v 1 ml kultury X_M . Viabilita v (podíl živých buněk) byla získána z rovnice (4).

$$v = (X - X_M) \cdot X^{-1} \quad (4)$$

4.7.2 Stanovení kultivační metodou

Kultura mikroorganismů byla vhodně desítkově ředěna destilovanou vodou na výsledné zředění Z a následně byl pipetován určitý objem V na Petriho misku.

Ke kultivaci bylo použito tuhé médium, sestávající z komerčního média Lactobacillus MRS Broth, agaru a destilované vody. MRS médium bylo naváženo v poměru 55,15 g média na 1 000 ml destilované vody a byl přidán agar v takovém množství, aby jeho koncentrace v médiu činila $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Směs byla rozpuštěna v destilované vodě a sterilována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem při teplotě 100°C po dobu 45 minut. Připraveným médiem byla přelita naředěná kultura na Petriho misce. Kultivace probíhala v termostatu při 37°C po dobu 48–96 hodin.

Pro každý vzorek probíhalo stanovení paralelně s různými zředěními, přičemž jednotlivá zředění byla připravována v triplicátech. Po kultivaci byly spočítány kolonie anaerobních mikroorganismů na Petriho miskách, na nichž se díky použitému zředění počet kolonií pohyboval v rozmezí 20–200. Z jednotlivých výsledků paralelních stanovení jednoho vzorku byl vypočten aritmetický průměr K . Počet buněk v 1 ml kultury X byl určen podle rovnice (5).

$$X = K \cdot Z \cdot V^{-1} \quad (5)$$

4.7.3 Stanovení metodou průtokové cytometrie

Kultura mikroorganismů byla $10\times$ naředěna destilovanou vodou a proměřena na průtokovém cytometru. Celkový počet buněk v 1 ml vzorku a popř. podíly buněk prokaryotických a eukaryotických byly zjištěny analýzou naměřených scattergramů.

Pro stanovení viability bylo k naředěné kultuře pipetováno 5 μl roztoku propidiumjodidu o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vzorky barvené propidiumjodidem byly ponechány nejméně 5 minut ve tmě a následně analyzovány průtokovým cytometrem. Sledována byla odezva na detektoru při vlnové délce 590 nm.

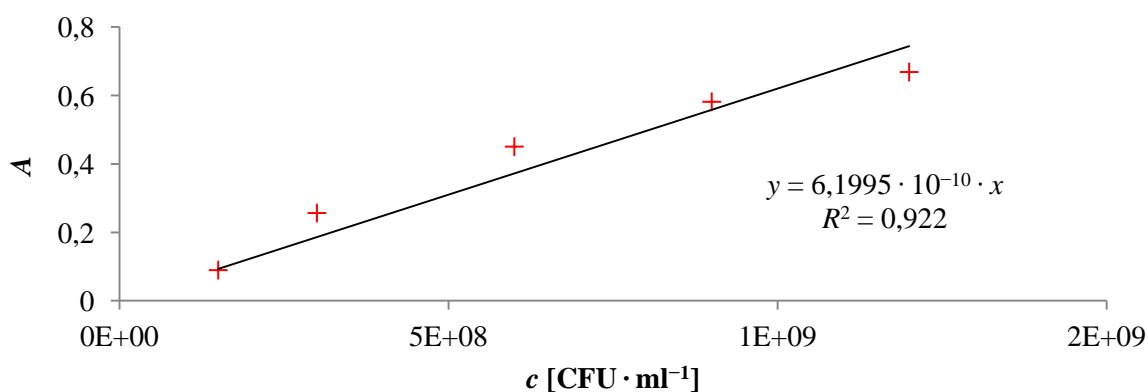
4.7.4 Stanovení spektrofotometrickým měřením zákalu

Kalibrační přímky pro zákal jednotlivých kmenů probiotických mikroorganismů byly naměřeny spektrofotometricky při vlnové délce 630 nm. Byly připraveny kultury jednotlivých kmenů probiotických bakterií do 50ml plastových zkumavek ze zmrazených kultur postupem popsáným v kapitole 4.6. Kultura mikroorganismů v plastové zkumavce byla centrifugována při 5 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut, supernatant byl odlit a sediment byl promyt v destilované vodě. Suspenze byla opět centrifugována za stejných podmínek, supernatant byl odlit a sediment byl rozsuspendován v 10 ml destilované vody. Takto připravená suspenze biomasy byla následně naředěna 2×, 10×, 20× a 100×. Kalibrační řada jednoho kmene probiotik tedy obsahovala 5 různých ředění biomasy. U každého ředění byl určen celkový počet buněk mikroskopickou metodou postupem popsáným v kapitole 4.7.1 a byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Z naměřených hodnot byly sestaveny kalibrační přímky jednotlivých kmenů probiotických bakterií.

Konkrétní postup stanovení se lišil u různých typů vzorků:

Počet buněk u neznámých vzorků obsahujících jednotlivé druhy probiotik byl určován následovně. Kultura mikroorganismů v plastové zkumavce byla centrifugována při 5 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut, supernatant byl odlit a sediment byl promyt v destilované vodě. Suspenze byla opět centrifugována za stejných podmínek, supernatant byl odlit a sediment byl rozsuspendován v objemu destilované vody. Byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Pakliže byla naměřená hodnota absorbance větší než 1, vzorek byl vhodně naředěn destilovanou vodou. Počet buněk v 1 ml kultury byl stanoven z kalibrační přímky.

Počet buněk u neznámých vzorků obsahujících směsi probiotických kmenů byl určován na základě McFarlandovy zákalové stupnice [61]. Vzorky byly upraveny podobně jako při spektrofotometrickém stanovení počtu buněk ve vzorcích obsahujících jednotlivé druhy probiotik (viz předchozí odstavec). Byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Pakliže byla naměřená hodnota absorbance větší než 1, vzorek byl vhodně naředěn destilovanou vodou. Počet buněk v 1 ml kultury byl stanoven z kalibrační přímky sestavené z hodnot McFarlandovy zákalové stupnice, která je včetně rovnice lineární regrese znázorněna na Obr. 6.



Obr. 6: Kalibrační přímka na základě McFarlandovy zákalové stupnice

U vzorků obsahujících také eukaryotické buňky kvasinek byl zjištěn poměr prokaryotických buněk (probiotik) k eukaryotickým buňkám (kvasinkám) pomocí metody průtokové cytometrie (viz kap. 4.7.3). Celková koncentrace buněk mikroorganismů, stanovená postupem popsáním v předchozích odstavcích, byla následně přepočtena na koncentraci buněk probiotik s využitím tohoto poměru.

4.8 Růstové křivky použitých kmenů probiotik

Růstové křivky probiotik byly stanoveny metodou spektrofotometrického měření zákalu v 96jamkových mikrotitračních destičkách na absorbančním ELISA readeru. U všech tří použitých kmenů proběhlo měření pro dva inokulační poměry:

1. 5% poměr inokulace: Do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 300 μ l MRS média a 15 μ l inokula.
2. 10% poměr inokulace: Do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 300 μ l MRS média a 30 μ l inokula.

Inokula byla připravována postupem popsáním v kapitole 4.6, přičemž jejich kultivace probíhala po dobu 20 h. U každého poměru inokulace byl také měřen slepý vzorek (čisté MRS médium). Všechny vzorky byly připraveny v triplikátech.

Mikrotitrační destička byla uzavřena a následně inkubována při 37 °C po dobu 20,5 hodin. Během této doby byla v časových intervalech po 30–60 minutách měřena absorbance vzorků v jamkách při vlnové délce 630 nm. Výsledná absorbance kultury byla zjištěna jako rozdíl absorbance v dané jamce a průměru absorbancí tří slepých vzorků v daném čase. Koncentrace biomasy byly vypočteny podle kalibračních křivek jednotlivých probiotických kmenů, které byly stanoveny postupem popsáním v kapitole 4.7.4.

U všech použitých kmenů probiotik byla stanovena koncentrace buněk a jejich viabilita v exponenciální a stacionární fázi růstu metodami vybranými na základě optimalizace (viz kap. 5.1) podle postupů uvedených v kapitole 4.7. Pro tento účel byly probiotické kmeny kultivovány po inokulaci v poměru 10 % v MRS médiu v 15ml zkumavkách při 37 °C. Vzorky ke stanovení byly odebrány v časech, které byly pro jednotlivé kmeny vybrány tak, aby odpovídaly exponenciálním a stacionárním fázím růstu, na základě výsledků růstových křivek (viz kap. 5.2).

4.9 Kultivace probiotických bakterií v modelových vzorcích piva

Byl testován růst jednotlivých kmenů probiotických bakterií v modelových vzorcích piva, tj. v MRS médiu s přídavkem ethanolu. Stanovení koncentrace buněk probíhalo spektrofotometrickým měřením zákalu v 96jamkových mikrotitračních destičkách na absorbančním ELISA readeru. Objemy ethanolu přidávaného do MRS média byly voleny tak, aby výsledné koncentrace odpovídaly objemovým koncentracím ethanolu v různých druzích piva:

1. kontrolní vzorek – 0 % obj. ethanolu,
2. výčepní pivo – 4 % obj. ethanolu,
3. ležák – 5 % obj. ethanolu.

Všechny vzorky byly u každého z kmenů připraveny pro dva inokulační poměry:

1. 5% poměr inokulace: Do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 300 µl MRS média, 15 µl inokula a 20 µl destilované vody nebo roztoku ethanolu o takové koncentraci, aby výsledná koncentrace byla 0 %, resp. 4 %, resp. 5 % ethanolu.
2. 10% poměr inokulace: Do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 250 µl MRS média a 25 µl inokula a 20 µl destilované vody nebo roztoku ethanolu o takové koncentraci, aby výsledná koncentrace směsi byla 0 %, resp. 4 %, resp. 5 % ethanolu.

Inokula byla připravována postupem popsáním v kapitole 4.6, přičemž jejich kultivace probíhala po dobu 20 h. U každého poměru inokulace a u každého typu modelového vzorku byly také měřeny slepé vzorky (čisté MRS médium s přísávkou destilované vody nebo roztoku ethanolu o výsledné koncentraci odpovídající příslušným vzorkům). Všechny vzorky byly připraveny v triplicátech.

Mikrotitrační destička byla uzavřena a následně inkubována při 37 °C. Byla měřena absorbance vzorků v jamkách v časových intervalech po 30–60 minutách při vlnové délce 630 nm. Výsledná absorbance kultury byla zjištěna jako rozdíl absorbance v dané jamce a průměru absorbancí tří slepých vzorků v daném čase. Koncentrace biomasy byly vypočteny podle kalibračních křivek jednotlivých probiotických kmenů, které byly stanoveny postupem popsáním v kapitole 4.7.4.

4.10 Kultivace probiotických bakterií v reálných vzorcích piva

U jednotlivých kmenů probiotických bakterií a směsí těchto kmenů (3 dvousložkových a 1 tříložkové) byl testován růst v reálných vzorcích piva, uvedených a popsáných v kapitole 4.5. Použité mikrobiální kmeny byly kombinovány za vzniku těchto směsí:

- dvousložková směs *L. acidophilus* a *B. breve*,
- dvousložková směs *L. acidophilus* a *B. bifidum*,
- dvousložková směs *B. breve* a *B. bifidum*,
- tříložková směs *L. acidophilus*, *B. breve* a *B. bifidum*.

Reálné vzorky piva byly vždy nejprve v plastových zkumavkách vloženy do ultrazvukové lázně a zde ponechány po dobu 30 minut za působení ultrazvuku, aby byly odplyněny. Různé typy experimentů, provedené za účelem testování růstu probiotik v reálných vzorcích piva, jsou popsány v následujících podkapitolách.

4.10.1 Kultivace jednotlivých kmenů na mikrotitračních destičkách

Nejprve byl sledován růst jednotlivých kmenů v reálných vzorcích piva v jamkách mikrotitrační destičky. Stanovení proběhlo metodou spektrofotometrického měření zákalu na absorbančním ELISA readeru. Na 96jamkovou destičku bylo pipetováno pivo a inokulum, a sice při dvou inokulačních poměrech:

1. 5% poměr inokulace: Pipetováno 300 µl příslušného reálného vzorku piva a 15 µl inokula.
2. 10% poměr inokulace: Pipetováno 300 µl příslušného reálného vzorku piva a 30 µl inokula.

Inokula byla připravována postupem popsáním v kapitole 4.6, přičemž jejich kultivace probíhala po dobu 20 h. U každého poměru inokulace a u každého typu reálného vzorku byly

také měřeny slepé vzorky (čisté pivo bez inokula). Všechny vzorky byly připraveny v triplicátech.

Mikrotitrační destička byla uzavřena a následně inkubována při 37 °C. Byla měřena absorbance vzorků v jamkách v časových intervalech po 30–60 minutách při vlnové délce 630 nm. Výsledná absorbance kultury byla zjištěna jako rozdíl absorbance v dané jamce a průměru absorbancí tří slepých vzorků v daném čase. Koncentrace biomasy byly vypočteny podle kalibračních křivek jednotlivých probiotických kmenů, které byly stanoveny postupem popsaným v kapitole 4.7.4.

Vzhledem k výsledkům (viz kap. 5.4.1) byl experiment opakován s inokuly připravenými postupem popsaným v kapitole 4.6, avšak s tím rozdílem, že jejich kultivace probíhala pouze po takovou dobu, aby inokulace piva proběhla v exponenciální fázi růstu kultury (na základě stanovených růstových křivek). Inokula probiotické bakterie *L. acidophilus* byla kultivována po dobu 11 hodin, zatímco inokula *Bifidobacterium* spp. byla kultivována po dobu 5,5 hodin.

4.10.2 Kultivace jednotlivých kmenů v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne

Růst jednotlivých kmenů v reálných vzorcích piva byl sledován také v 50ml plastových zkumavkách. 50 ml jednotlivých reálných vzorků piva bylo v plastových zkumavkách vloženo do ultrazvukové lázně a zde ponecháno po dobu 30 minut za působení ultrazvuku. Následně bylo pivo filtrováno přes 0,2µm stříkačkové filtry do 50ml plastových zkumavek.

Inokula byla připravena postupem popsaným v kapitole 4.6, přičemž inokula probiotické bakterie *L. acidophilus* byla kultivována po dobu 11 hodin, zatímco inokula *Bifidobacterium* spp. byla kultivována po dobu 5 hodin a 30 minut. Inokulace tak probíhala v exponenciální fázi růstu bakteriálních kultur. Před očkováním byla biomasa převedena z MRS média do destilované vody. Inokula byla centrifugována po dobu 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu, supernatant byl odlit a sediment byl promyt v destilované vodě. Suspenze byla opět centrifugována za stejných podmínek, supernatant byl odlit a sediment byl rozsuspendován v 10 ml destilované vody.

Do každého vzorku piva byl pipetován 1 ml takto připraveného inokula (kultury převedené do destilované vody). Kultivace probíhala při teplotě 8 °C po dobu 7 dní.

Stejným způsobem byly připraveny také kontrolní vzorky všech piv, které nebyly inokulovány. Tyto byly také ponechány při teplotě 8 °C po dobu 7 dní.

Koncentrace viabilních buněk probiotických bakterií ve vzorcích v čase $t = 0$, tj. na počátku kultivace, byla stanovena kultivační metodou. Na konci kultivace, čili v čase $t = 7$ dní, bylo provedeno stanovení koncentrace a viability buněk probiotik metodami vybranými na základě optimalizace (viz kap. 5.1) a bylo měřeno pH všech vzorků pomocí pH metru. Všechny metody byly prováděny podle postupů uvedených v kapitole 4.7.

4.10.3 Kultivace směsí kmenů v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne

Na základě výsledků kultivace jednotlivých kmenů v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne (viz kap. 5.4.2) byl vybrán reálný vzorek piva, ve kterém jednotlivé kmeny vykazovaly buď nejintenzivnější nárůst biomasy, nebo alespoň nejméně intenzivní pokles viability. U tohoto piva byl proveden obdobný experiment v 50ml plastových zkumavkách za účelem sledování růstu směsí kmenů.

Úprava piva (působení ultrazvuku, filtrace) a příprava inokul proběhly stejnými postupy, jaké jsou popsány v kapitole 4.10.2. Byly však připraveny 2 řady vzorků:

1. Vzorky s koncentrovanější biomasou směsí probiotik: Očkování proběhlo příslušnými inokuly jednotlivých kmenů, převedenými do destilované vody pomocí centrifugace a dvojího promývání.
2. Vzorky se zředěnou biomasou směsí probiotik: Inokula (kultury převedené do destilované vody) byla naředěna desítkovým systémem za vzniku zředěných kultur o zředění 10^{-3} oproti původním inokulům. Očkování proběhlo těmito zředěnými inokuly.

Také byl připraven kontrolní vzorek piva, který nebyl inokulován. Kultivace všech vzorků probíhala při teplotě 8 °C po dobu 7 dní.

Koncentrace viabilních buněk ve vzorcích v čase $t = 0$, tj. na počátku kultivace, byla stanovena kultivační metodou. Na konci kultivace, čili v čase $t = 7$ dní, bylo provedeno stanovení koncentrace a viability buněk probiotik metodami vybranými na základě optimalizace (viz kap. 5.1) a bylo měřeno pH všech vzorků. Všechny metody byly prováděny podle postupů uvedených v kapitole 4.7.

4.10.4 Kultivace směsí kmenů v plastových zkumavkách po dobu 9 týdnů

Experiment pro sledování růstu směsí probiotických kmenů v 50ml plastových zkumavkách po dobu 9 týdnů byl proveden postupem identickým, jaký je popsán v kapitole 4.10.3. Kultivace probíhala při teplotě 8 °C po dobu 9 týdnů.

Koncentrace viabilních buněk ve vzorcích v čase $t = 0$, tj. na počátku kultivace, byla stanovena kultivační metodou. Na konci kultivace, čili v čase $t = 9$ týdnů, bylo provedeno stanovení koncentrace a viability buněk probiotik metodami vybranými na základě optimalizace (viz kap. 5.1) a bylo měřeno pH všech vzorků pomocí pH metru. Všechny metody byly prováděny podle postupů uvedených v kapitole 4.7.

4.11 Příprava piva obohaceného probiotiky

Svrchně kvašené pivo obohacené probiotiky bylo vařeno ze sladových výtažků Pale Ale, chmelu Sládek a sušených svrchních kvasnic Safale S-04 postupem popsaným v následujících podkapitolách. V celkem třech várkách byly připraveny vzorky obsahující všechny jednotlivé kmeny probiotických bakterií i všechny směsi (3 dvousložkové a 1 tříložková), přičemž inokulace proběhla po zchlazení mladiny před hlavním kvašením. Pro každou várku byly také připraveny kontrolní vzorky, které nebyly naočkovány žádnou probiotickou kulturou. Byl sledován počet buněk probiotických bakterií ve vybraných časech hlavního kvašení i zrání piva.

4.11.1 Chmelovar

Objem 25 l kohoutkové vody byl ohříván na topné desce. Do mírně ohřáté vody bylo za intenzivního míchání převedeno 4,25 kg sladových výtažků Pale Ale a směs byla přivedena k varu. Za mírného varu byly přidávány pelety chmelu Sládek s 8,08% obsahem α -hořkých kyselin. Postup chmelení byl zvolen tak, aby výsledná hořkost byla 15 IBU. Nejprve bylo přidáno 12 g chmelu, po 60 minutách varu dalších 6 g a po 15 minutách posledních 6 g, po

čemž následovalo ještě 15 minut varu. Celková doba varu tedy byla 90 minut. Po celou dobu byla varná nádoba otevřená, aby mohly vytékat nežádoucí látky, např. DMS a thiole. Po uplynutí doby chmelovaru byla doplněna odpařená voda na původní celkový objem 25 l.

4.11.2 Chlazení a separace kalů

Mladina byla chlazená pomocí nerezové chladicí smyčky, ponořené do mladiny. Do potrubí chladicí smyčky byla přivedena studená voda a přitom byla měřena teplota mladiny. Mladina byla zchlazena na teplotu 20 °C a následně byla oddělena od kalu přepuštěním do jiné nádoby. Byla refraktometricky stanovena hodnota EPM mladiny a bylo změřeno pH.

4.11.3 Zakvašení

Ze zchlazené mladiny bylo odebráno 200 ml a v tomto objemu bylo rozsuspendováno množství 11,5 g sušených kvasnic Safale S-04 pro svrchní kvašení. Suspenze byla ponechána 20 minut při laboratorní teplotě. Takto připraveným inokulem byl zaočkován celý objem 25 l mladiny a zakvašená mladina byla převedena do 5litrových potravinářských kbelíků; do každého kbelíku byl odměřen objem 3 l.

4.11.4 Inokulace probiotickými kulturami

Inokula byla připravena postupem uvedeným v kapitole 4.10.2. V celkem třech várkách byly připraveny vzorky dle Tab. 9, tj. v jedné várce vždy celkem 8 vzorků. V prvních dvou várkách byly připraveny vzorky piva inokulované kulturami jednotlivých kmenů *Bifidobacterium* spp. a *L. acidophilus* a jejich dvousložkových směsí, všechny vzorky v duplikátech. Ve třetí várce byl připraven kvadruplikát vzorku piva inokulovaného tříložkovou směsí obsahující všechny použité kmeny. U každé várky byl připraven také kontrolní vzorek, a to u prvních dvou várek v duplikátech a u třetí várky v kvadruplikátu.

Tab. 9: Připravené vzorky piva obohaceného probiotiky a kontrolní vzorky

	1. várka	2. várka	3. várka
1	<i>B. breve</i> (R1, R2)	<i>L. acidophilus</i> (L1, L2)	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. breve</i> a <i>B. bifidum</i> (IRL1, IRL2, IRL3, IRL4)
2			
3	<i>B. bifidum</i> (I1, I2)	<i>L. acidophilus</i> a <i>B. breve</i> (RL1, RL2)	
4			
5	<i>B. breve</i> a <i>B. bifidum</i> (IR1, IR2)	<i>L. acidophilus</i> a <i>B. bifidum</i> (IL1, IL2)	kontrolní vzorek č. 3 (O31, O32, O33, O34)
6			
7	kontrolní vzorek č. 1 (O11, O12)	kontrolní vzorek č. 2 (O21, O22)	
8			

Koncentrace viabilních buněk probiotických bakterií v čase $t = 0$, tj. po inokulaci na začátku hlavního kvašení, byla u všech vzorků stanovena kultivační metodou postupem popsaným v kapitole 4.7.2.

V první a druhé várce probíhala dále (v průběhu kvašení) stanovení počtu a viability buněk u všech připravených vzorků, zatímco u třetí várky byla stanovení prováděna pouze ze

dvou vzorků inokulovaných a ze dvou vzorků kontrolních, neboť zbylé vzorky z replikátů u třetí várky byly ponechány pro senzorickou analýzu (viz kap. 4.13).

4.11.5 Hlavní kvašení

Mladina v potravinářských kbelících, inokulovaná kvasniční a probiotickou kulturou, byla přikryta víky s kvasnými zátkami. Kvašení probíhalo 3–4 dny při laboratorní teplotě, v průběhu bylo měřeno EPM refraktometricky, byl sledován vzhled hladiny kvasící tekutiny a případně byla odebírána vznikající pěna. Signály pro ukončení hlavního kvašení byly pomalu klesající až ustálené hodnoty EPM a propadlá deka na hladině mladého piva.

U první a druhé várky byla stanovena také koncentrace viabilních buněk probiotických bakterií v čase $t = 2$ dny, tj. v průběhu hlavního kvašení, a sice kultivační metodou postupem popsáným v kapitole 4.7.2.

4.11.6 Dokvašování piva

Po dokončení hlavního kvašení byly vzorky přepuštěny do tmavých 330ml PET lahví; z jednoho vzorku o objemu 3 l v kbelíku bylo vytvořeno vždy 8 vzorků v PET lahvích, každý o objemu 300 ml. PET lahve byly uzavřeny víčky a ponechány v chladu při teplotě 8 °C po dobu 33–34 dní.

Stanovení koncentrace a viability probiotických buněk bylo prováděno v několika různých časech dokvašování piva, a to pokaždé kultivační metodou a ve vybraných časech také dalšími metodami. Všechny metody byly prováděny podle postupů uvedených v kapitole 4.7. Při každém stanovení byl použit nový, dříve neotevřený vzorek v PET lahvi. Na konci dokvašování bylo změřeno pH a byla refraktometricky stanovena hodnota EPM hotového piva u všech vzorků, včetně vzorků pro senzorickou analýzu.

4.12 Chromatografická analýza připraveného piva

Vzorky piva určené pro senzorickou analýzu byly po 37 dnech kvašení analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí (HPLC-RI) za účelem stanovení vybraných chemických parametrů.

Nejprve byly vzorky upraveny následujícím způsobem: 5 ml vzorku piva bylo naředěno Milli-Q vodou v odměrné baňce na celkový objem 10 ml, tzn. celkové ředění 2×. Pro vysrážení proteinů bylo přidáno 200 µl Carrezova činidla I a 200 µl Carrezova činidla II. Vzniklá směs byla centrifugována v plastových zkumavkách při 8 000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut. K chromatografickému stanovení byl po centrifugaci použit supernatant, přefiltrovaný přes 45µm nylonový stříkačkový filtr.

K analýze metodou HPLC-RI byla následně využita sestava Dionex UltiMate 3 000 Series s kolonou Rezex ROA-Organic Acid H⁺. Mobilní fázi představovala kyselina sírová o koncentraci 0,005 mol · l⁻¹, jejíž rychlost průtoku při analýze byla 0,6 ml · min⁻¹. Termostat kolony byl vyhřátý na teplotu 60 °C, nástřik vzorku probíhal pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 µl. Celková doba analýzy trvala 25 minut.

Metodou HPLC-RI byly ve vzorcích stanovovány analyty uvedené v Tab. 10. Ke každému analytu je v tabulce uveden retenční čas t_R , regresní rovnice kalibrační přímky

s koeficientem determinace R^2 a koncentrační veličiny včetně jednotek, na které byla podle regresních rovnic přepočítávána naměřená data.

Tab. 10: Analyty stanovené metodou HPLC-RI

	t_R [min]	Rovnice kalibrační přímky	R^2	Veličina [jednotka]
Ethanol	21,85	$y = 17,1552x$	0,9999	φ [% obj.]
Kyselina mléčná	13,21	$y = 3,7492x$	0,9999	c_m [g · l ⁻¹]

4.13 Senzorická analýza piva obohaceného probiotiky

Některé připravené vzorky piva obohaceného probiotik byly charakterizovány z hlediska organoleptických vlastností v senzorické analýze. Hodnoceno bylo několik parametrů:

- intenzita barvy piva,
- intenzita zakalení, příp. přítomnost sedliny (čirost piva),
- přijatelnost vůně piva,
- intenzita hořké chuti,
- intenzita kyselé chuti,
- intenzita sladké chuti,
- přítomnost cizích chutí a přípachů, příp. jejich intenzita,
- míra podobnosti hodnoceného vzorku klasickému svrchně kvašenému pivu,
- celková přijatelnost organoleptických vlastností piva.

Dotazník pro senzorickou analýzu vzorků je připojen k této práci, uvádí jej Příloha 3.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

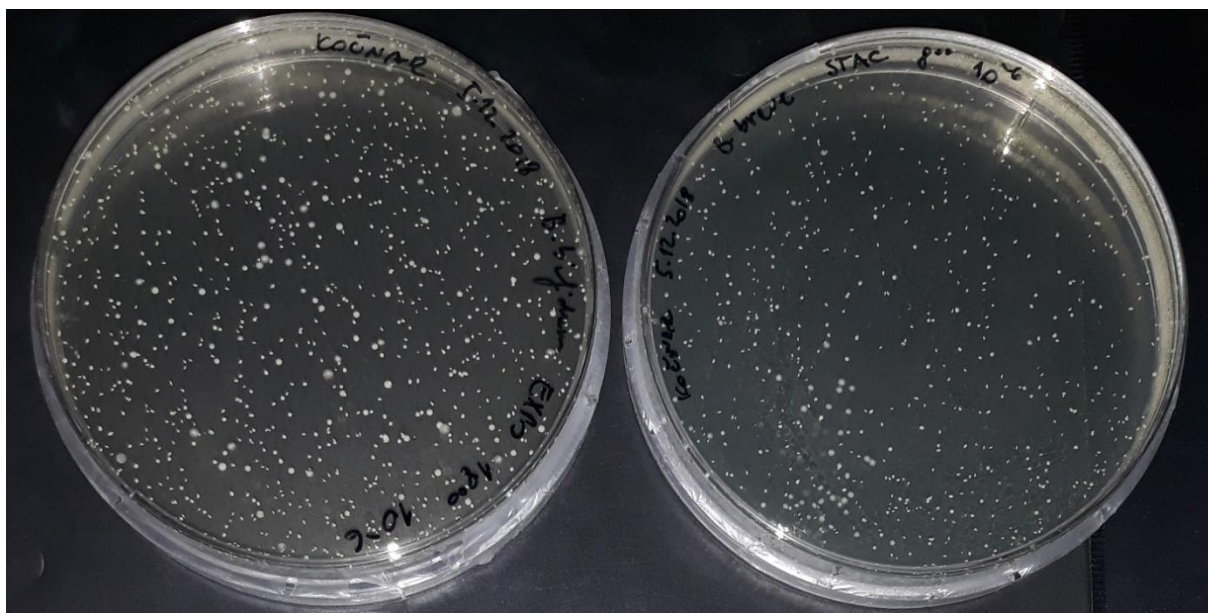
Předložená diplomová práce je zaměřena na přípravu a charakterizaci piva obohaceného probiotiky. Především je kladen důraz na stanovení vybraných mikrobiologických parametrů piva, konkrétně koncentrace a viability buněk probiotických bakterií.

5.1 Optimalizace stanovení počtu a viability buněk probiotických bakterií

Pro dosažení cílů práce bylo nejprve nutné optimalizovat metody stanovení počtu, resp. koncentrace a viability použitých kmenů probiotických bakterií. Za účelem nalezení optimální metody stanovení počtu a viability buněk probiotických bakterií za daných podmínek bylo testováno několik metod.

První z nich bylo přímé stanovení počtu buněk počítáním v Bürkerově komůrce pod optickým mikroskopem, tj. metoda mikroskopická, prováděná podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.1. Jedná se o metodu časově náročnou, avšak poměrně přesnou, umožňující jak stanovení celkové koncentrace biomasy, tak potenciálně i podílu živých buněk při využití vitálního barvení. Bylo však zjištěno, že po vitálním barvení methylenovou modří nelze při použitém zvětšení pod optickým mikroskopem stanovit viabilitu buněk, neboť není možno rozeznat obarvené bakteriální buňky od buněk neobarvených. Metoda mikroskopická byla tedy použita pouze pro měření kalibrační přímky pro spektrofotometrickou metodu měření zákalu, avšak nebyla dále aplikována pro stanovování počtu a viability buněk probiotik ve vzorcích.

Dále byla testována metoda kultivace naředěné probiotické kultury v tuhém médiu, tj. metoda kultivační, prováděná podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.2. V MRS agaru bylo po 2–3 dnech kultivace při teplotě 37 °C možno pozorovat narostlé kolonie probiotických bakterií. Příklad takových kolonií probiotických bakterií *B. bifidum* a *B. breve* je uveden na Obr. 7.



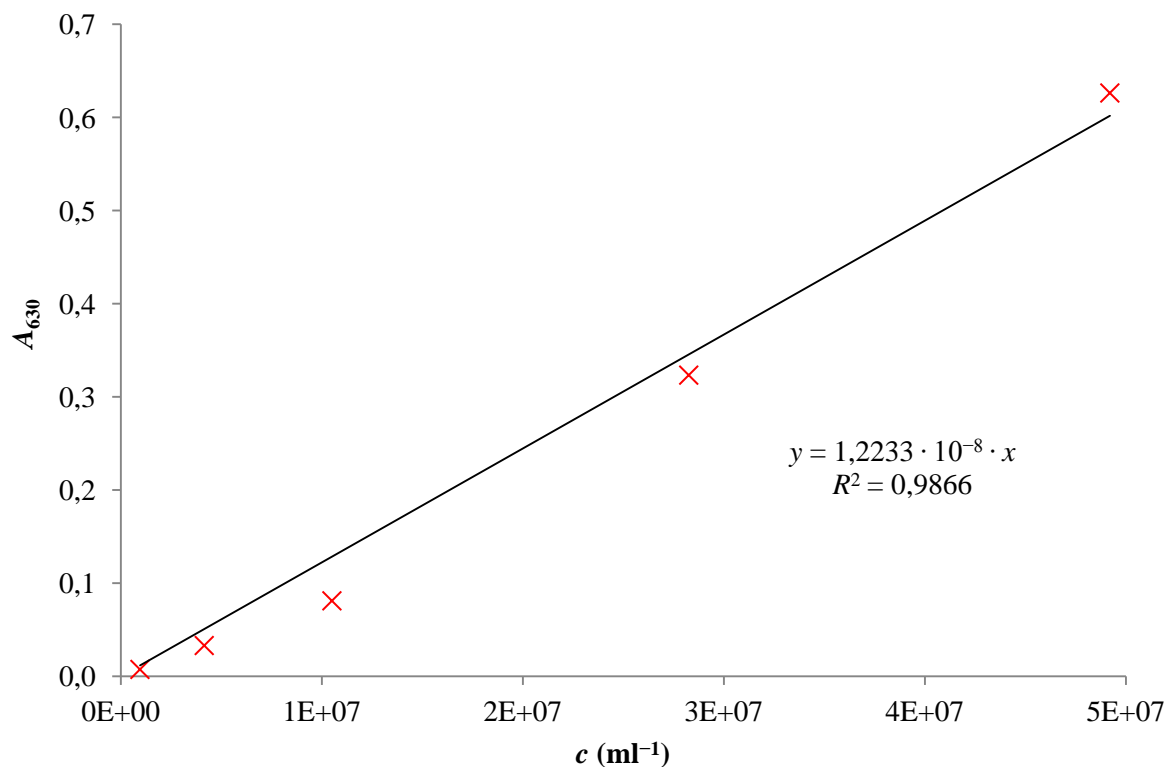
Obr. 7: Kolonie bakterií *B. bifidum* a *B. breve* v tuhých médiích

Vzhledem k tomu, že kultivační metoda poskytuje poměrně přesné informace o počtu viabilních buněk probiotik ve vzorku, byl tento způsob stanovení aplikován v dalších experimentech.

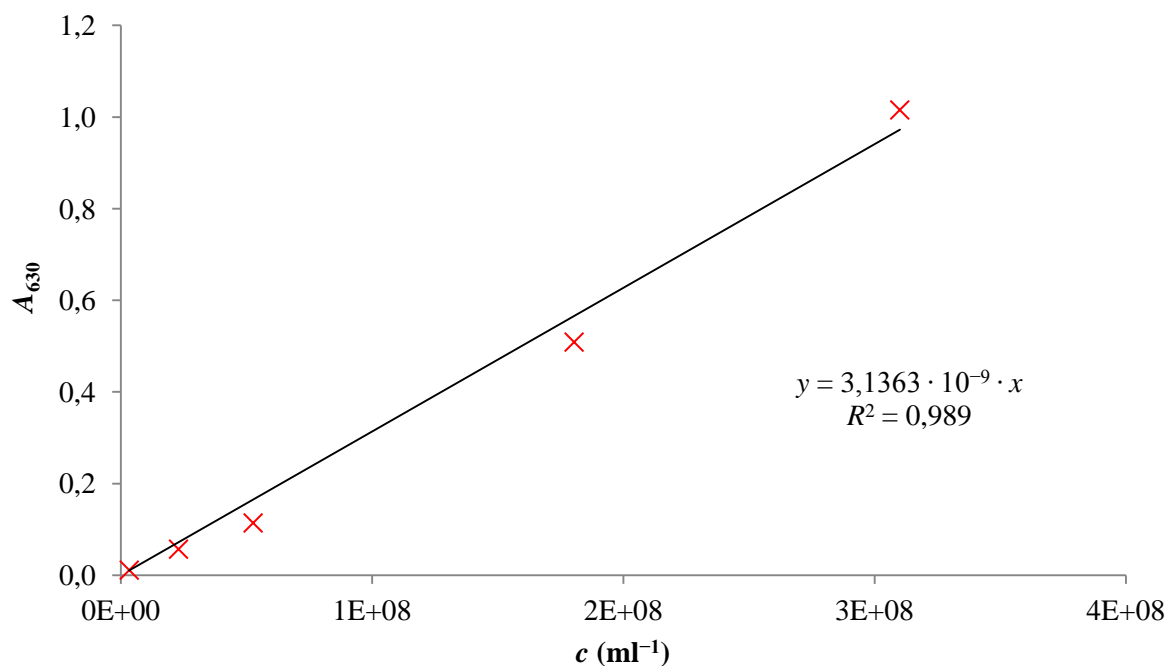
Z instrumentálních metod byla pro optimalizaci zvolena metoda průtokové cytometrie (*flow cytometry* – FC), která byla prováděna podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.3. Jejím základním výstupem je informace o celkovém počtu buněk ve vzorku, popř. s rozlišením buněk prokaryotických a eukaryotických. Po vitálním barvení propidiumjodidem lze však také stanovit viabilitu buněk díky měření fluorescenčního signálu. Jedná se o moderní, rychlou a přesnou metodu, která byla dále v této práci také používána ke stanovení počtu a viability buněk.

Další optimalizovanou instrumentální technikou byla metoda spektrofotometrického měření zákalu, jejíž postup je uveden v kapitole 4.7.4. Tato technika je jednoduchým a rychlým způsobem stanovení počtu buněk, avšak oproti ostatním metodám poskytuje poměrně nepřesné hodnoty. Výsledkem je celkový počet živých a mrtvých buněk, přičemž na základě samotného spektrofotometrického stanovení nelze usoudit, jaký podíl připadá na buňky viabilní. Spektrofotometrické měření zákalu bylo pro svou jednoduchost a rychlost také aplikováno v následujících experimentech, přičemž pro získání počtu živých buněk byly použity hodnoty stanovené u daných vzorků metodou průtokové cytometrie.

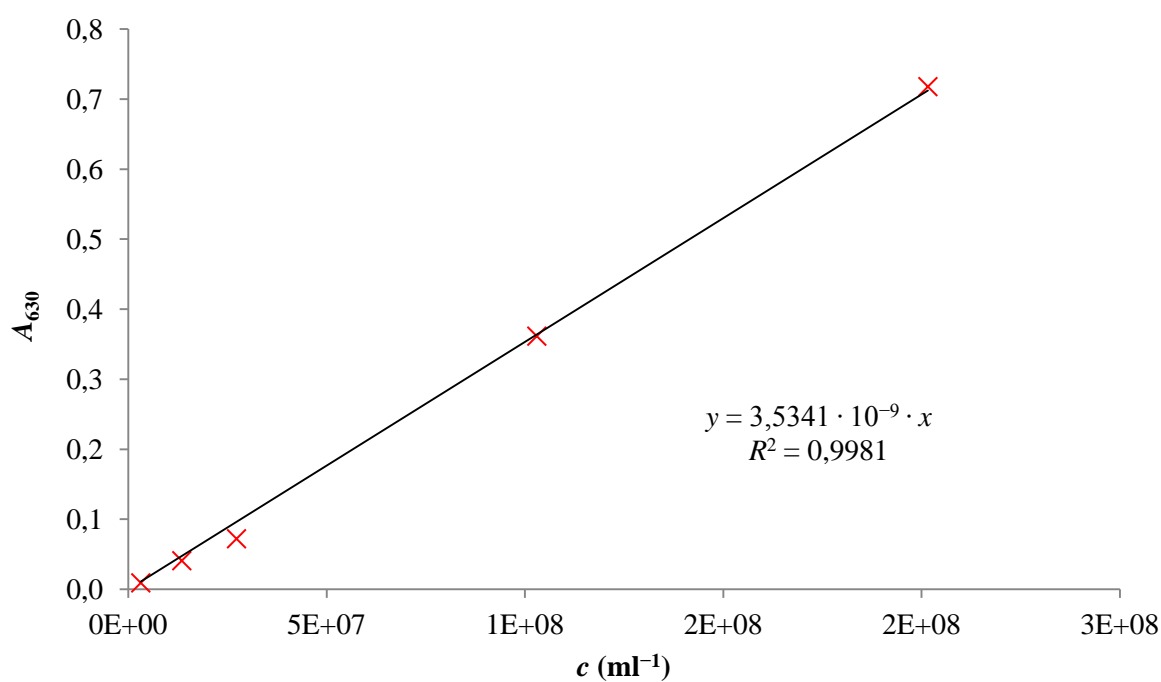
Kalibrační přímky a rovnice lineární regrese pro spektrofotometrické měření zákalu, tvořeného jednotlivými kmeny probiotických mikroorganismů, jsou znázorněny na Obr. 8, Obr. 9 a Obr. 10.



Obr. 8: Kalibrační přímka pro kmen bakterie *L. acidophilus*



Obr. 9: Kalibrační přímka pro kmen bakterie *B. breve*



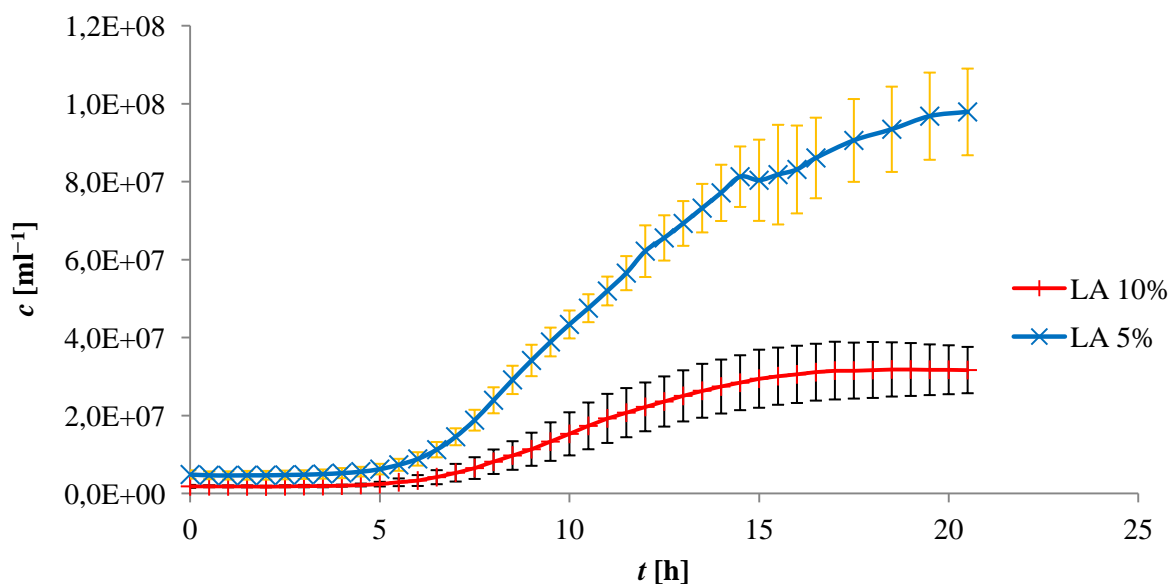
Obr. 10: Kalibrační přímka pro kmen bakterie *B. bifidum*

Pro stanovení počtu a viability probiotických bakterií ve vzorcích v následujících experimentech byly vybrány celkem tři metody:

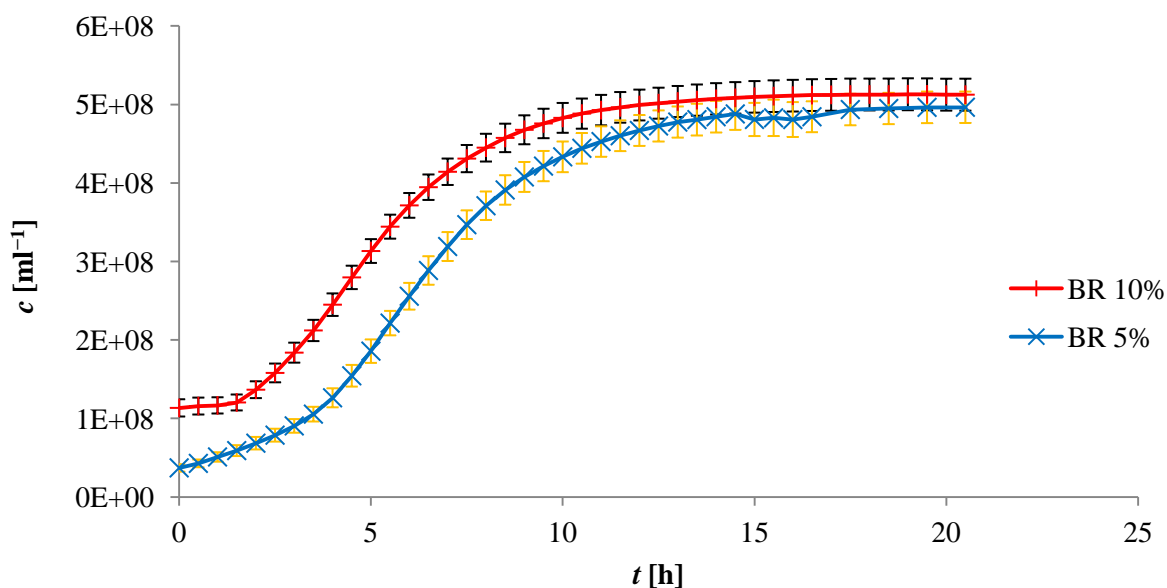
1. metoda kultivační;
2. metoda průtokové cytometrie s vitálním barvením propidiumjodidem;
3. metoda spektrofotometrického měření zákalu (s následným využitím výsledků viability a příp. podílu prokaryotických buněk z metody průtokové cytometrie).

5.2 Růstové křivky použitých kmenů probiotik

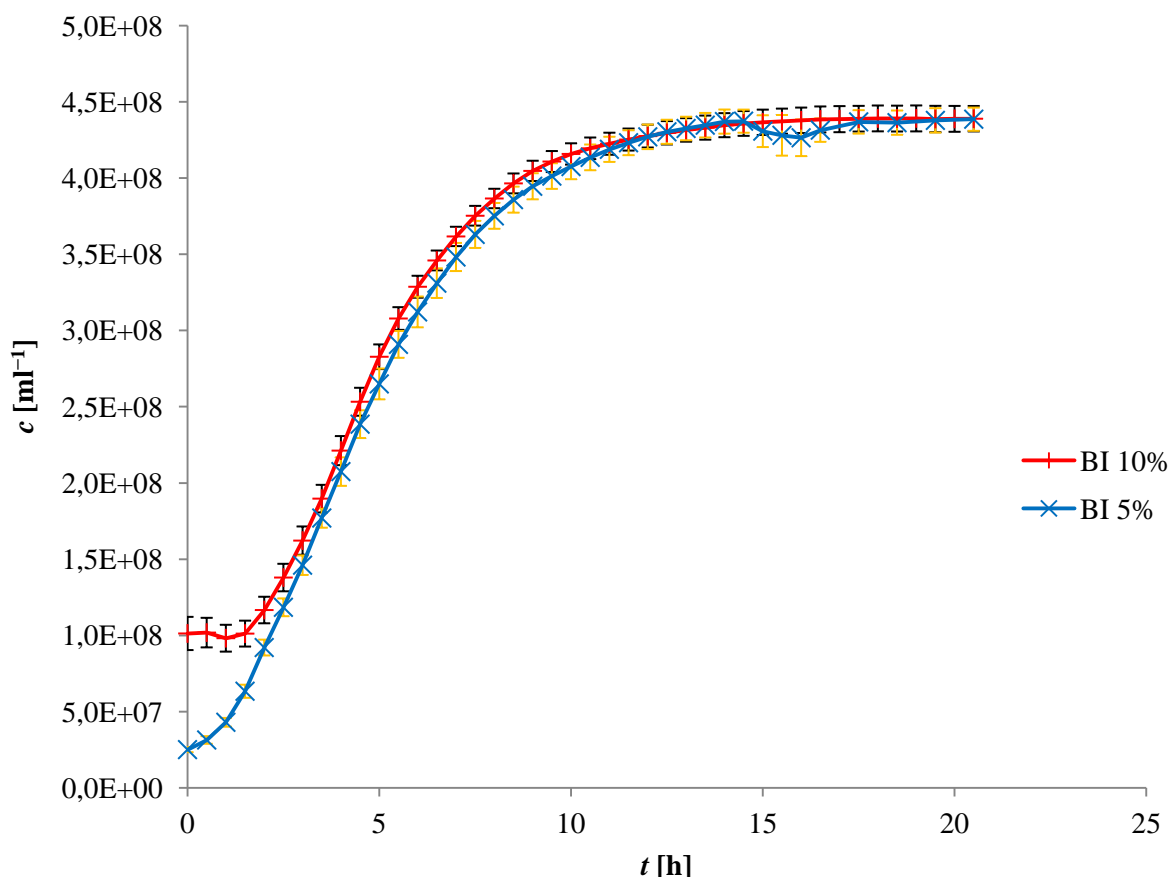
Po zvolení metod stanovení cílových parametrů byly naměřeny růstové křivky jednotlivých kmenů probiotických bakterií, a sice spektrofotometrickou metodou pomocí ELISA readeru dle postupu uvedeného v kapitole 4.8. U každého kmene byl sledován růst po inokulaci v 5% a 10% inokulačním poměru za účelem stanovení doby trvání jednotlivých fází při experimentálních podmínkách kultivace a pro porovnání vlivu inokulačního poměru. Výsledné hodnoty koncentrací biomasy c v závislosti na čase t jsou vyneseny v grafech na Obr. 11, Obr. 12 a Obr. 13, střední kvadratické chyby jsou znázorněny chybovými úsečkami.



Obr. 11: Růstové křivky probiotického kmene *L. acidophilus* (LA) v inokulačních poměrech 5% (LA 5%) a 10% (LA 10%)



Obr. 12: Růstové křivky probiotického kmene *B. breve* (BR) v inokulačních poměrech 5% (BR 5%) a 10% (BR 10%)



Obr. 13: Růstové křivky probiotického kmene *B. bifidum* (BI) v inokulačních poměrech 5% (BI 5%) a 10% (BI 10%)

Z grafů je zřejmé, že ani u jednoho kmene nemá inokulační poměr znatelný vliv na dobu trvání jednotlivých fází. Lze však pozorovat, že při nižším inokulačním poměru dochází u všech kmenů v exponenciální fázi k rychlejšímu růstu. U kmenů *Bifidobacterium* spp. je potom ve stacionární fázi koncentrace biomasy u obou inokulačních poměrů srovnatelná. Naopak u kmene bakterie *L. acidophilus* je rychlost růstu koncentrace biomasy výrazně vyšší při inokulaci v poměru 5 %. Je možné, že příčina tohoto jevu spočívá v mikroareofilní povaze použitého kmene *L. acidophilus* [62]. Do jamky mikrotitrační destičky byl u testů s 5% inokulačními poměry pipetován o 15 μl menší objem než u testů s poměry 10%, a tudíž při nižším poměru inokulace docházelo k vyššímu kontaktu kyslíku s kulturou, což mohlo způsobit větší nárůst biomasy.

Při porovnání Obr. 11 s Obr. 12 a Obr. 13 je možno zpozorovat, že lag fáze kmene *L. acidophilus* je mnohem delší, než u kmenů *Bifidobacterium* spp. Také ostatní fáze růstových křivek mají u laktobacilu delší průběh oproti bifidobakteriím. Všechny tři kmeny se dostávají do stacionární fáze růstu již v prvním dni kultivace.

S ohledem na skutečnost, že spektrofotometrická měření podávají pouze informaci o celkové koncentraci biomasy, a nikoliv o viabilitě kultury, byla následně provedena kultivace jednotlivých kmenů v tekutém médiu a v určitých bodech růstu byla sledována

viabilita kultury s využitím metody průtokové cytometrie podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.3. Také byla vybranými metodami stanovena koncentrace biomasy. Stanovení probíhalo v exponenciální fázi růstu *L. acidophilus* (po 11 h kultivace) a *Bifidobacterium* spp. (po 5,5 h kultivace) a poté ve stacionární fázi růstu všech kmenů (vždy po 20 h kultivace). Výsledné hodnoty shrnují Tab. 11, Tab. 12 a Tab. 13.

Tab. 11: Koncentrace biomasy, stanovené spektrofotometrickým měřením zákalu

	koncentrace biomasy c [ml ⁻¹]		
	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. bifidum</i>
exponenciální fáze	$(2,85 \pm 0,21) \cdot 10^8$	$(1,29 \pm 0,05) \cdot 10^9$	$(1,15 \pm 0,07) \cdot 10^9$
stacionární fáze	$(5,98 \pm 0,27) \cdot 10^8$	$(2,63 \pm 0,08) \cdot 10^9$	$(2,05 \pm 0,10) \cdot 10^9$

Tab. 12: Koncentrace viabilních buněk, stanovené kultivační metodou

	koncentrace viabilních buněk c [CFU/ml]		
	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. bifidum</i>
exponenciální fáze	$(4,82 \pm 0,65) \cdot 10^8$	$(2,62 \pm 0,13) \cdot 10^9$	$(9,06 \pm 0,20) \cdot 10^9$
stacionární fáze	$> 10^9$	$(6,10 \pm 0,54) \cdot 10^9$	$> 10^{10}$

Tab. 13: Koncentrace a podíl živých buněk, stanovené metodou průtokové cytometrie

		<i>L. acidophilus</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. bifidum</i>
expon. fáze	koncentrace živých buněk [ml ⁻¹]	$6,86 \cdot 10^6$	$2,82 \cdot 10^7$	$1,24 \cdot 10^7$
	podíl živých buněk [%]	61,2	80,1	81,0
stacion. fáze	koncentrace živých buněk [ml ⁻¹]	$2,47 \cdot 10^7$	$6,15 \cdot 10^7$	$6,57 \cdot 10^7$
	podíl živých buněk [%]	77,9	73,3	75,9

Z výsledků všech použitých metod vyplývá, že dochází k růstu bakterií, neboť všechny hodnoty naměřené v exponenciální fázi jsou menší než hodnoty naměřené ve fázi stacionární. Všechny metody potvrdily nárůst koncentrace biomasy v rámci jednoho řádu (u kultivační metody se některé výsledky nepodařilo přesně kvantifikovat v důsledku nedostatečného zředění kultury). Tyto výsledky jsou ve shodě s naměřenými růstovými křivkami.

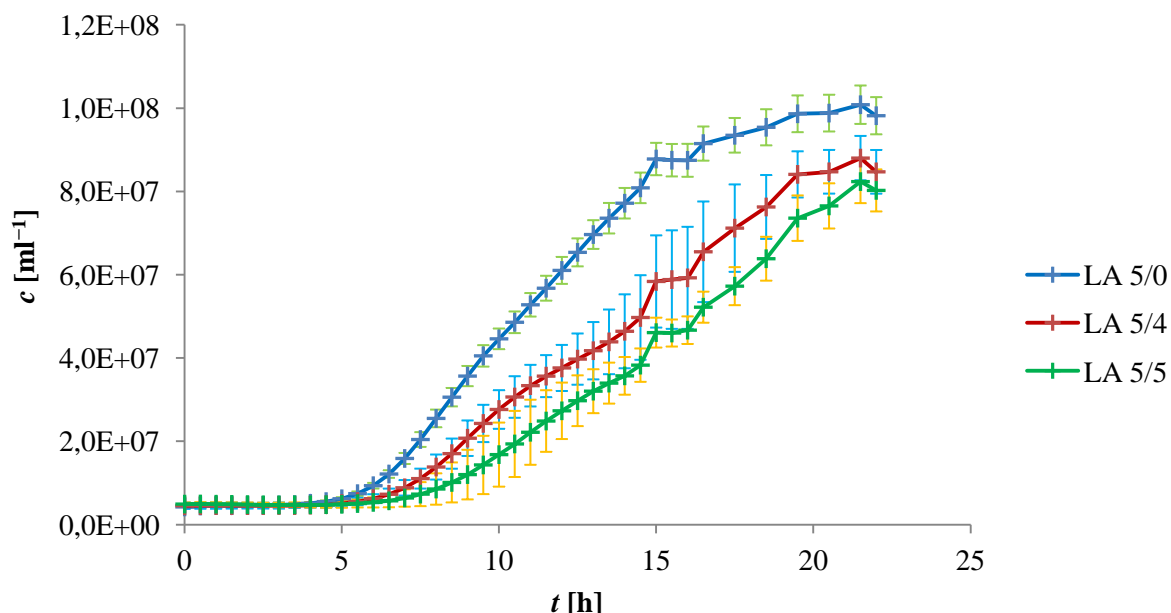
Z Tab. 12 a Tab. 13 navíc vyplývá, že dochází také k růstu koncentrace viabilních buněk, přičemž v porovnání s exponenciální fází bylo ve fázi stacionární u všech kmenů stanoveno více živých buněk. Podíl živých buněk v kulturách ve stacionární fázi byl u obou kmenů *Bifidobacterium* spp. nižší než v exponenciální fázi, avšak u kmene *L. acidophilus* došlo k nárůstu tohoto podílu. Je možné, že u *L. acidophilus* docházelo k masivnějším ztrátám viability buněk v lag fázi růstové křivky, čímž se snížil celkový podíl živých buněk v exponenciální fázi, a následně byl nárůst koncentrace živých buněk tak podstatný, že výsledný podíl ve stacionární fázi v čase měření byl vyšší než ve fázi exponenciální. Navíc u bakterie *L. acidophilus* proběhlo měření v počáteční části stacionární fáze, kdy ještě nedochází k takovému snížení životaschopnosti kultury. Naopak u bifidobakterií byly odebrány vzorky až v pokročilém stádiu stacionární fáze, kdy už jsou ztráty viability podstatnější, a proto se projeví také na poklesu podílu živých buněk, jak lze pozorovat v Tab. 13.

5.3 Kultivace probiotických bakterií v modelových vzorcích piva

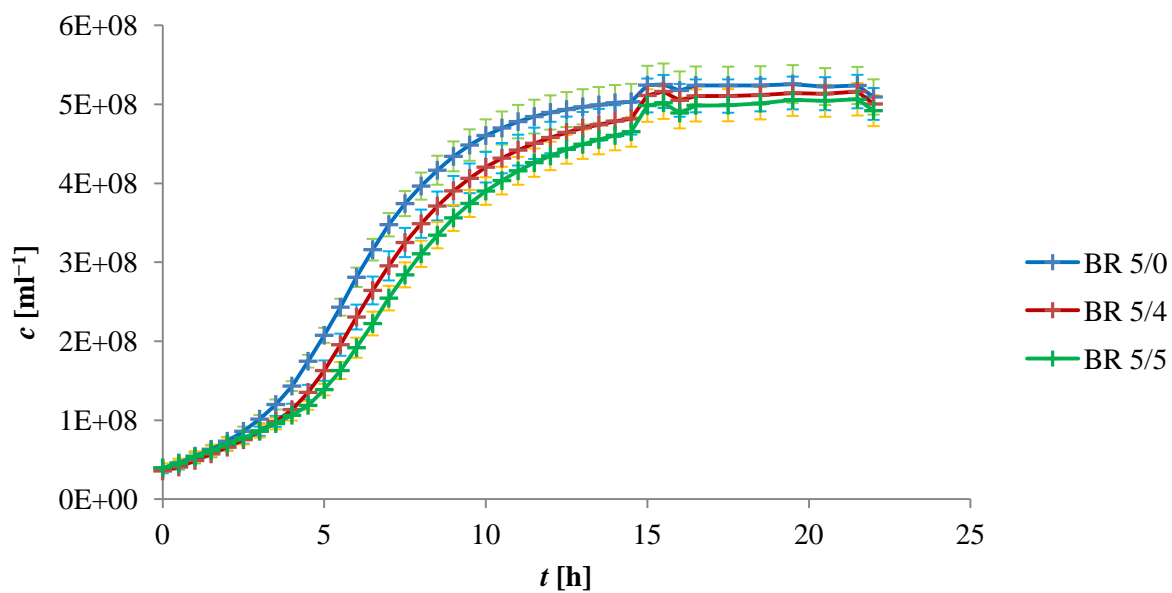
Jakmile byly naměřeny růstové křivky, a tedy byly známy doby trvání růstových fází, byla provedena kultivace probiotik v modelových vzorcích piva, v jejímž průběhu se sledoval růst jednotlivých kmenů probiotických bakterií v MRS médiu s různými koncentracemi ethanolu, simulujícím alkoholové prostředí reálného piva. Tento experiment byl proveden s cílem zhodnotit vliv ethanolu na růstové charakteristiky použitých probiotik, neboť ethanol je jednou ze základních antimikrobiálních látek přítomných v pivu. Růstové křivky probiotik v modelových vzorcích byly naměřeny spektrofotometricky pomocí ELISA readeru dle postupu uvedeného v kapitole 4.9. U každého kmene byl sledován růst po inokulaci v 5% a 10% inokulačním poměru.

Na Obr. 14 a Obr. 15 je možno vidět příklady grafických znázornění výsledných hodnot koncentrací biomasy c v závislosti na čase t u všech tří modelových vzorků pro bakterie *L. acidophilus* a *B. breve* v 5% inokulačním poměru; střední kvadratické chyby jsou znázorněny chybovými úsečkami. V legendách ke grafům značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a čísla za lomítkem koncentraci ethanolu v procentech. Vzhledem k vysoké podobnosti výsledných křivek byly vybrány pouze tyto příklady, ostatní grafy uvádí Příloha 1.

Výsledky vycházející ze všech naměřených dat jsou shrnuty v Tab. 14, do které byly vybrány hodnoty koncentrací biomasy c z několika významných časů stanovení. Nejprve je vždy uvedena hodnota na počátku kultivace, tj. v čase $t = 0$, dále hodnota v exponenciální fázi, tj. u laktobacilu v čase $t = 13$ h a u bifidobakterií v čase $t = 8$ h, a ve stacionární fázi, tj. u laktobacilu v čase $t = 20,5$ h a u bifidobakterií v čase $t = 15$ h. V tabulce jsou také uvedeny střední kvadratické chyby Δc .



Obr. 14: Růstové křivky kmene *L. acidophilus*, kultivovaného v modelových vzorcích při různých koncentracích ethanolu (inokulační poměr 5 %). V legendě značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a čísla za lomítkem koncentraci ethanolu v procentech.



Obr. 15: Růstové křivky kmene *B. breve*, kultivovaného v modelových vzorcích při různých koncentracích ethanolu (inokulační poměr 5 %). V legendě značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a čísla za lomítkem koncentraci ethanolu v procentech.

Tab. 14: Koncentrace biomasy ve vybraných časech růstových křivek

	poměr inokulace [%]	koncentrace ethanolu [% obj.]	$t = 0$		exponenciální fáze		stacionární fáze	
			c	Δc	c	Δc	c	Δc
			[10^7 ml^{-1}]		[10^7 ml^{-1}]		[10^7 ml^{-1}]	
LA	5	0	0,42	0,02	6,96	0,34	9,88	0,44
		4	0,45	0,08	4,17	0,69	8,47	0,52
		5	0,49	0,04	3,20	0,53	7,65	0,54
	10	0	0,76	0,06	7,77	0,72	10,43	0,74
		4	0,77	0,06	6,29	0,62	9,16	0,73
		5	0,73	0,07	3,44	0,19	7,35	1,22
BR	5	0	3,90	0,26	39,65	1,72	52,43	2,45
		4	3,57	0,29	34,88	1,79	51,12	2,14
		5	3,98	0,55	31,07	1,67	49,84	2,07
	10	0	6,09	0,25	39,37	1,54	49,88	2,12
		4	5,80	0,28	36,87	1,45	49,83	1,95
		5	6,00	0,57	34,64	1,62	49,06	1,97
BI	5	0	2,35	0,05	39,73	0,85	46,35	1,21
		4	2,57	0,39	36,98	0,87	45,85	0,88
		5	2,60	0,46	35,77	1,22	45,39	1,04
	10	0	4,30	0,09	39,19	0,85	43,70	1,03
		4	3,80	0,10	36,32	0,61	43,59	0,73
		5	3,96	0,18	35,12	0,73	43,25	0,73

Z výsledků uvedených v Tab. 14 i z křivek na Obr. 14 a Obr. 15 je patrné, že ethanol neinhibuje růst ani jednoho z použitých kmenů probiotických bakterií. Koncentrace ethanolu má pouze malý vliv na výslednou koncentraci biomasy; konkrétně lze říci, že s rostoucí koncentrací ethanolu klesá koncentrace buněk probiotik. Například použitý kmen bakterie *B. breve* po inokulaci v 5% poměru dosahoval ve stacionární fázi v době měření koncentrace $(5,24 \pm 0,25) \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ v médiu neobsahujícím ethanol, $(5,11 \pm 0,21) \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ při 4% koncentraci ethanolu; $(4,98 \pm 0,21) \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ při 5% koncentraci ethanolu. Toto zjištění je v souladu se skutečností, že probiotika rodů *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* jsou obecně ethanol-tolerantní mikroorganismy. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) ethanolu se u různých kmenů laktobacilů pohybuje v rozmezí 6–20 % a minimální baktericidní koncentrace (MBC) v rozmezí 6–25 % [38].

Při porovnání jednotlivých křivek v rámci Obr. 11 a Obr. 12, ale také při porovnání Obr. 11 s Obr. 14 a Obr. 12 s Obr. 15 je zřejmé, že přítomnost ethanolu neovlivňuje doby trvání lag fáze či ostatních fází růstové křivky.

Také bylo zjištěno, že ani v tomto experimentu neměl poměr inokulace významný vliv na výsledné hodnoty koncentrací biomasy.

Z hlediska problematiky přípravy piva obohaceného probiotiky je možné tvrdit, že samotný ethanol, který je produktem kvašení, nebude mít negativní vliv na viabilitu probiotik. Koncentrace ethanolu v běžných druzích piva (stolního, výčepního, plného či ležáku) se totiž pohybují povětšinou do 5–6 %.

5.4 Kultivace probiotických bakterií v reálných vzorcích piva

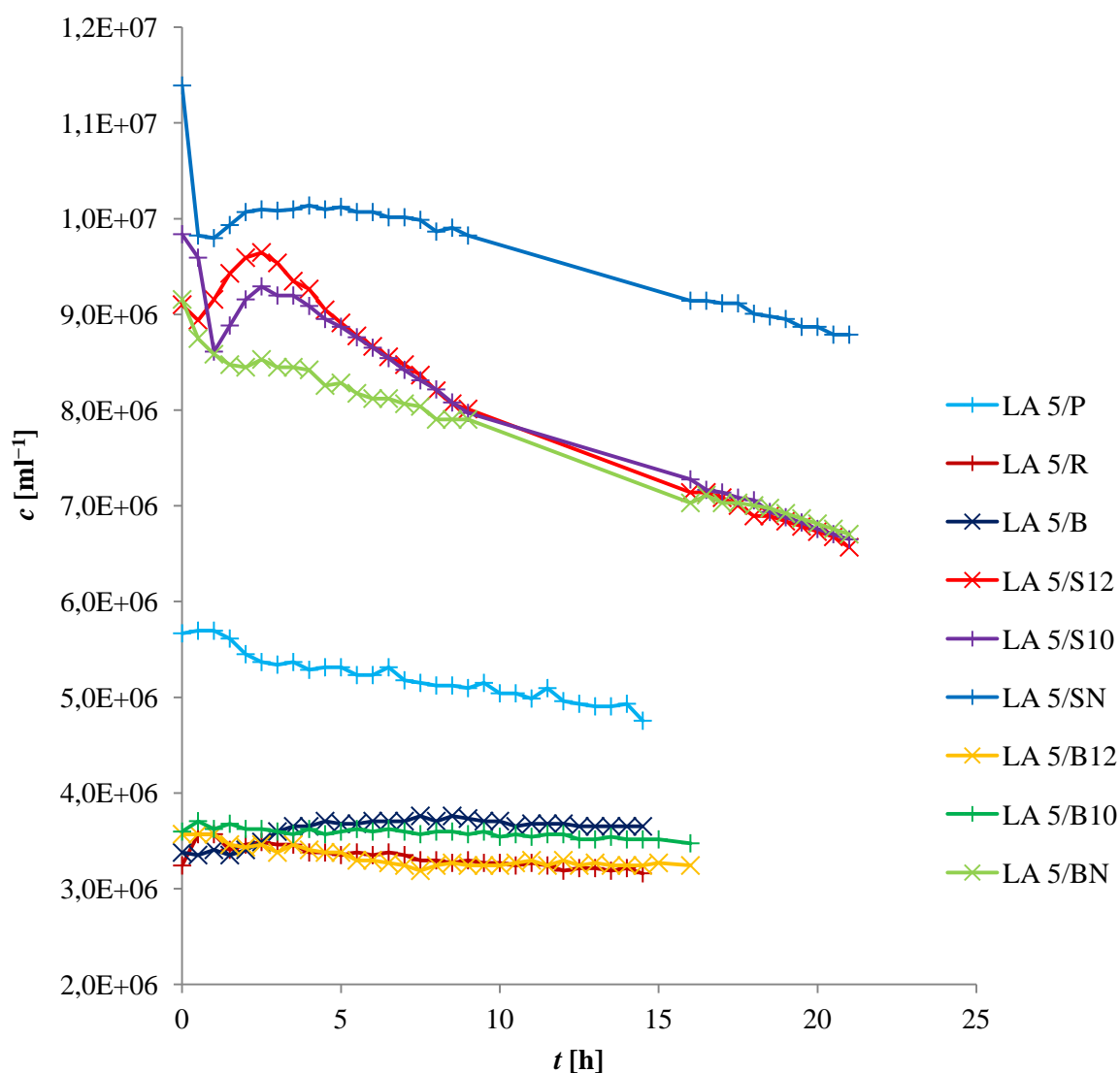
V návaznosti na kultivaci probiotik v modelových vzorcích bylo provedeno několik experimentů, jejichž podstatou byla kultivace použitých kmenů v reálném pivu. Byl studován růst jednotlivých kmenů probiotických bakterií včetně jejich směsí v prostředí reálných vzorků piva, jejichž výčet a specifikace jsou uvedeny v Tab. 8. Byly vybrány vzorky různých druhů piv od různých výrobců, aby byl zhodnocen vliv technologie výroby piva na růstové charakteristiky probiotik.

5.4.1 Kultivace na mikrotitračních destičkách

Podobně jako u minulých experimentů byla provedena nejprve kultivace při 37 °C na mikrotitračních destičkách, kdy byly naměřeny růstové křivky probiotik v reálných vzorcích metodou spektrofotometrického měření zákalu pomocí ELISA readeru dle postupu uvedeného v kapitole 4.10.1. Pro každý kmen byl u všech reálných vzorků sledován růst po inokulaci v 5% a 10% inokulačním poměru.

Nejdříve byla testována inokulace piva jednotlivými kmeny probiotik ve stacionární fázi růstu, tj. u všech kmenů po 20 h kultivace inokula, tzn. stejným způsobem, jako byly měřeny růstové křivky v médiu i v modelových vzorcích. Na Obr. 16 je znázorněn příklad grafu výsledných hodnot koncentrací biomasy c v závislosti na čase t pro bakterii *L. acidophilus* v 5% inokulačním poměru ve všech použitých vzorcích piv po inokulaci ve stacionární fázi. Střední kvadratické chyby v podobě chybových úseček nejsou pro větší přehlednost do grafu vyneseny; relativní chyby se u většiny měření pohybovaly do 15 %. V legendě ke grafu značí

čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a zkratky za lomítkem použitý reálný vzorek piva (použití zkratk dle Tab. 8).



Obr. 16: Růstové křivky kmene *L. acidophilus*, kultivovaného v reálných vzorcích piva po inokulaci ve stacionární fázi (inokulační poměr 5 %). V legendě značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a zkratky za lomítkem použitý reálný vzorek piva (použití zkratk dle Tab. 8).

Vzhledem k vysokému množství dat byly vybrány pouze tyto příklady růstových křivek. Grafická znázornění růstu všech kmenů probiotik v reálných vzorcích piva při obou inokulačních poměrech uvádí Příloha 2. Růstové křivky pro jednotlivé druhy piv jsou si z hlediska průběhu velmi podobné, nezávisle na použitém kmenu probiotika. Rozdíly existují spíše právě mezi použitými druhy piv, kdy u některých vzorků byla výsledná tendence v koncentraci biomasy klesající, zatímco u jiných nedocházelo k růstu ani poklesu hodnot. Pro prezentaci výsledků vycházejících ze všech naměřených dat bylo provedeno shrnutí v Tab. 15, do které byly vybrány hodnoty koncentrací biomasy c z několika různých časů stanovení.

Tab. 15: Koncentrace biomasy ve vybraných časech růstových křivek při kultivaci jednotlivých kmenů probiotik v reálných vzorcích pív (stacionární fáze)

vzorek píva	poměr inokulace [%]	LA				BR				BI			
		$t = 0$	$t = 6 \text{ h}$	$t = 12 \text{ h}$	$t = 18,5 \text{ h}$	$t = 0$	$t = 6 \text{ h}$	$t = 12 \text{ h}$	$t = 18,5 \text{ h}$	$t = 0$	$t = 6 \text{ h}$	$t = 12 \text{ h}$	$t = 18,5 \text{ h}$
		$c [10^6 \text{ ml}^{-1}]$				$c [10^7 \text{ ml}^{-1}]$				$c [10^7 \text{ ml}^{-1}]$			
P	5	5,67	5,23	4,96	–	3,63	3,62	3,51	–	2,24	1,86	1,75	–
	10	10,79	9,92	9,40	–	6,59	6,09	5,70	–	3,35	2,74	2,74	–
R	5	3,24	3,35	3,19	–	2,03	1,86	1,71	–	1,52	1,33	1,25	–
	10	6,43	6,38	6,02	–	4,36	3,88	3,78	–	3,38	2,59	2,44	–
B	5	3,38	3,71	3,68	–	3,19	3,63	3,67	–	1,53	1,37	1,32	–
	10	6,51	6,84	6,73	–	2,56	3,04	3,12	–	3,68	3,14	2,93	–
S12	5	9,10	8,67	–	6,89	7,93	6,48	–	4,01	8,80	6,59	–	3,95
	10	21,89	18,71	–	15,42	15,17	12,90	–	8,43	15,55	11,68	–	7,55
S10	5	9,84	8,65	–	6,93	8,97	7,56	–	5,14	9,58	7,31	–	5,53
	10	18,09	19,63	–	15,74	17,21	14,30	–	10,64	16,69	13,03	–	9,93
SN	5	11,39	10,07	–	8,98	10,42	9,26	–	8,69	7,89	6,63	–	5,85
	10	20,95	20,48	–	18,98	16,71	14,43	–	13,10	16,84	12,94	–	10,31
B12	5	3,57	3,30	3,30	–	2,24	2,20	2,07	–	1,66	1,52	1,46	–
	10	7,33	6,27	5,67	–	2,75	2,53	2,37	–	3,76	3,36	3,30	–
B10	5	3,60	3,60	3,57	–	2,10	2,40	2,50	–	1,79	1,48	1,48	–
	10	7,63	7,43	7,22	–	3,06	3,02	3,04	–	3,32	2,61	2,56	–
BN	5	9,16	8,12	–	6,98	6,82	8,08	–	7,61	7,28	7,29	–	6,65
	10	20,14	21,38	–	19,06	14,89	15,31	–	14,42	15,39	14,37	–	13,51

Zkratky reálných vzorků pív jsou použity dle Tab. 8. U několika vzorků v Tab. 15 nejsou uvedeny hodnoty, neboť dané vzorky nebyly ve vybraných časech proměřeny. Důvodem bylo v některých případech předčasné ukončení kultivace kvůli ustáleným hodnotám absorbancí, jindy chyba přístroje, v jejímž důsledku nebyla ukládána data, a tudíž výsledky nejsou k dispozici.

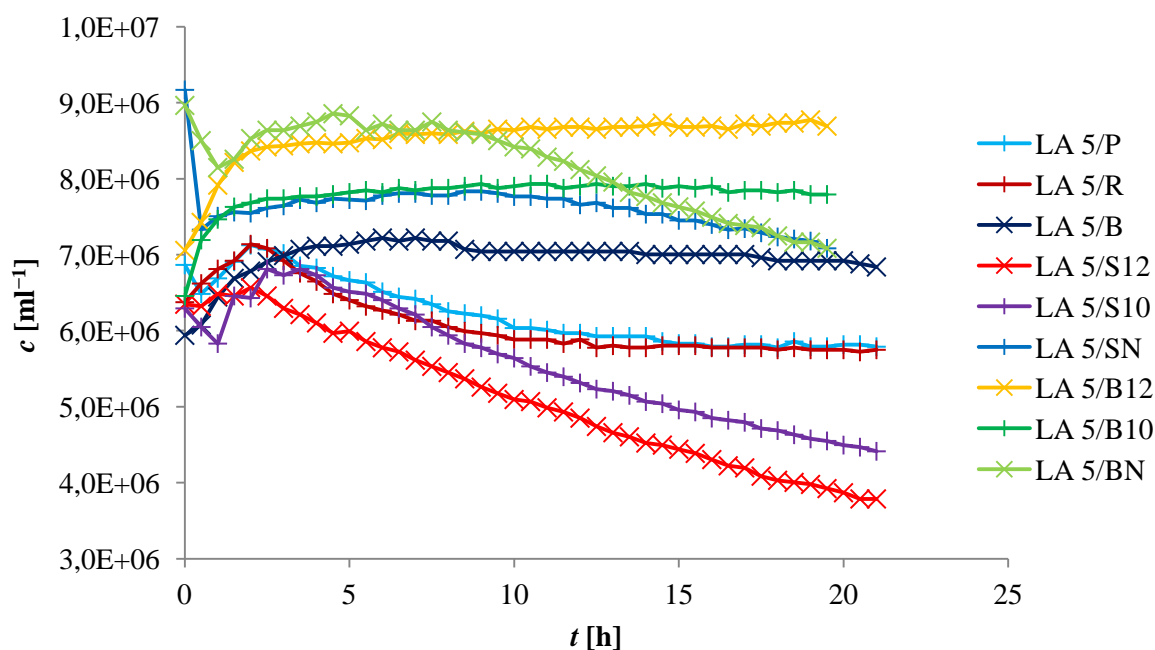
Přestože byly u všech hodnot vypočteny také střední kvadratické chyby, nejsou pro větší přehlednost v Tab. 15 uvedeny. Relativní chyba byla u většiny výsledků nejvýše 15 %.

Dle grafu na Obr. 16 a na základě porovnání hodnot koncentrací buněk jednotlivých kmenů v Tab. 15 lze usoudit, že ve zkoumaných reálných vzorcích piva nedochází v celkové bilanci k významnému nárůstu biomasy žádného z použitých kmenů. Výsledná data naopak ukazují ve většině případů mírný pokles koncentrací biomasy. Tento jev je možné vysvětlit lyzí bakteriálních buněk, které ztratily životaschopnost.

V Tab. 15 jsou žlutě podbarveny výsledky koncentrací buněk těch kmenů, které vykazovaly alespoň mírný nárůst biomasy v daných vzorcích piva. Jedná se o kmeny *L. acidophilus* a *B. breve* ve vzorcích Birell při obou inokulačních poměrech a dále o *B. breve* také ve vzorcích Bernard Desítka a Bernard s čistou hlavou Free při inokulaci v poměru 5 %.

Nutno však stále brát v úvahu, že z výsledků spektrofotometrické metody nelze usuzovat o přesné viabilitě buněk, poněvadž je pravděpodobné, že v daném čase obsahuje kultura kromě viabilních buněk také mrtvé buňky probiotik, u kterých nedošlo k lyzi, a tyto také přispívají k výsledné absorbanci suspenze. Navíc po lyzi buňky se do prostředí uvolňují buněčné komponenty, které mohou měnit absorpční vlastnosti prostředí, tudíž na základě tohoto nelze určit konkrétní hodnoty koncentrací viabilních buněk v kultuře.

Vzhledem k zjištění, že při provedeném postupu nedocházelo ve většině případů k podstatnějšímu nárůstu biomasy, byl experiment opakován s rozdílem, že inokulace piva probíhala v exponenciální fázi růstu probiotických bakterií (na základě dříve naměřených růstových křivek). Na Obr. 17 je znázorněn příklad grafu výsledných hodnot koncentrací biomasy c v závislosti na čase t pro bakterii *L. acidophilus* v 5% inokulačním poměru ve všech použitých vzorcích piva při inokulaci v exponenciální fázi. Do grafu opět nejsou vyneseny chybové úsečky; relativní chyby se u většiny měření pohybovaly do 15 %. V legendě ke grafu značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a zkratky za lomítkem použitý reálný vzorek piva.



Obr. 17: Růstové křivky kmene *L. acidophilus*, kultivovaného v reálných vzorcích piva po inokulaci v exponenciální fázi (inokulační poměr 5 %). V legendě ke grafu značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a zkratky za lomítkem použitý reálný vzorek piva.

Tab. 16: Koncentrace biomasy ve vybraných časech růstových křivek při kultivaci jednotlivých kmenů probiotik v reálných vzorcích pív (exponenciální fáze)

vzorek piva	poměr inokulace [%]	LA				BR				BI			
		$t = 0$	$t = 6 \text{ h}$	$t = 12 \text{ h}$	$t = 18,5 \text{ h}$	$t = 0$	$t = 6 \text{ h}$	$t = 12 \text{ h}$	$t = 18,5 \text{ h}$	$t = 0$	$t = 6 \text{ h}$	$t = 12 \text{ h}$	$t = 18,5 \text{ h}$
		$c [10^6 \text{ ml}^{-1}]$				$c [10^6 \text{ ml}^{-1}]$				$c [10^7 \text{ ml}^{-1}]$			
P	5	6,87	6,51	5,97	5,86	9,35	4,68	3,93	4,04	2,49	2,27	2,10	2,02
	10	15,89	17,37	16,28	15,60	16,05	14,14	11,58	10,95	5,43	4,77	4,33	4,06
R	5	6,38	6,27	5,89	5,78	5,21	5,21	4,78	4,46	3,23	2,65	2,45	2,24
	10	15,40	17,25	16,73	15,91	13,02	13,76	11,85	11,05	6,66	5,47	5,08	4,78
B	5	5,94	7,22	7,04	6,92	4,89	7,33	6,80	7,01	3,02	2,94	2,92	2,89
	10	13,90	16,16	15,97	15,53	12,75	12,33	9,67	9,46	6,17	5,60	5,35	5,21
S12	5	6,35	5,78	4,85	4,01	5,63	5,31	4,36	4,04	3,04	2,33	1,80	1,51
	10	13,73	16,35	14,06	12,10	13,71	12,75	10,73	10,36	6,01	4,86	3,83	3,45
S10	5	6,29	6,40	5,31	4,63	5,53	6,06	4,78	4,78	3,68	3,18	2,57	2,38
	10	14,77	13,52	13,13	13,00	19,02	16,15	11,90	10,52	7,38	4,74	4,07	3,82
SN	5	9,17	7,78	7,66	7,21	10,36	9,09	8,93	8,98	3,32	2,99	3,02	3,02
	10	17,13	16,42	16,27	15,33	20,88	14,61	12,86	12,38	7,30	6,02	5,48	5,11
B12	5	7,06	8,52	8,68	8,73	7,23	6,70	6,59	6,27	3,33	2,67	2,51	2,38
	10	15,21	16,02	15,01	14,44	16,47	15,30	14,45	13,60	6,85	5,81	5,50	5,30
B10	5	6,46	7,82	7,90	7,85	7,44	8,40	7,86	7,55	3,56	3,29	3,10	2,97
	10	16,13	18,05	17,67	16,88	17,96	17,43	15,41	14,99	6,85	5,81	5,50	5,30
BN	5	8,96	8,72	8,04	7,17	11,69	7,44	7,01	7,01	4,00	3,57	3,40	3,23
	10	17,55	18,20	17,58	16,51	21,36	11,05	9,46	9,35	7,33	6,05	5,07	4,41

Zkratky reálných vzorků pív jsou použity dle Tab. 8.

V Tab. 17 nejsou pro větší přehlednost uvedeny střední kvadratické chyby hodnot. Relativní chyba byla u většiny výsledků nejvýše 35 %.

Další grafy růstových křivek všech kmenů probiotik pro oba inokulační poměry uvádí Příloha 2. V naprosté většině případů lze v křivkách pozorovat klesající tendenci koncentrace biomasy. Často vyskytujícím se jevem je vzrůst hodnot v prvních 5 hodinách kultivace, načež následuje pozvolnější klesání až pod výchozí hodnotu koncentrace buněk. Klesání koncentrací biomasy lze vysvětlit již zmíněnou lyzí buněk. Průběh křivek však nelze zobecnit na jednotlivé druhy piva, použité kmeny probiotik, ani poměry inokulace.

Pro prezentaci výsledků vycházejících ze všech naměřených dat bylo provedeno shrnutí v Tab. 16, do které byly vybrány hodnoty koncentrací biomasy c z několika různých časů stanovení. Žlutě jsou zde podbarveny výsledky koncentrací buněk těch kmenů, které vykazovaly alespoň mírný nárůst biomasy v daných vzorcích piva. U kmene *L. acidophilus* docházelo k nárůstu koncentrací ve vzorcích Birell a Bernard Desítka (při obou inokulačních poměrech), při inokulaci v poměru 10 % také ve vzorku Radegast a při inokulaci 5 % ve vzorku Bernard Dvanáctka. U kmene *B. breve* byl při 5% inokulačním poměru zaznamenán nárůst koncentrací ve vzorcích Birell a Bernard Desítka. Lze konstatovat, že inokulace v exponenciální fázi růstu použitých probiotických bakterií poskytuje lepší výsledky.

Z celkového posouzení výsledků provedených experimentů, tzn. z grafů na Obr. 16 a Obr. 17 i z hodnot v Tab. 15 a Tab. 16, vyplývá, že ve většině reálných vzorků piva nedochází k podstatnějšímu růstu použitých kmenů probiotických bakterií. Důvodem může být vysoký obsah α -hořkých kyselin v pivu, neboť tyto látky jsou antimikrobiálně účinné a pro pivo mají význam nejen senzorický, ale právě i konzervační, tj. působí zde proti případné kontaminaci. Všechna použitá piva se řadí ke spodně kvašeným pivům plzeňského (českého) typu, u kterých bývá obsah hořkých látek z chmele poměrně vysoký [59]. Jiným možným vysvětlením může být nedostatečný obsah pro bakterie esenciálních v prostředí piva. Je totiž známo, že probiotické bakterie jsou mikroorganismy poměrně náročné na složení kultivačního média [7].

Na druhou stranu je pozitivním zjištěním, že i přes jistou míru snížení viability nedochází k úplné lýze všech přítomných buněk probiotik. Je tedy pravděpodobné, že určitý podíl viabilních probiotických bakterií v pivu zůstává. Podle výsledků těchto experimentů s použitím spektrofotometrického stanovení se jako odolnější (alespoň krátkodobě) jeví kmeny *L. acidophilus* a *B. breve*. Největší nárůst koncentrací biomasy byl zaznamenán při kultivaci kmene *L. acidophilus* v nealkoholickém pivu Birell při inokulaci v poměru 10 % v exponenciální fázi růstu inokula. V tomto případě došlo ve sledovaném čase ke zvýšení koncentrace z původní hodnoty $(1,39 \pm 0,09) \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$ na $(1,55 \pm 0,07) \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$.

5.4.2 Kultivace v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne

Se stejnými reálnými vzorky piva byla následně provedena experimentální kultivace v 50ml plastových zkumavkách s cílem určit dlouhodobou stabilitu probiotik v pivu, tedy jaký podíl buněk zaočkovaných probiotických bakterií bude připadat na buňky viabilní po 1 týdnu ponechání piva obohaceného probiotiky při teplotě 8 °C. Nízká teplota kultivace byla zvolena pro simulaci uchovávání piva v chladu. Ke stanovení koncentrací živých buněk probiotik bylo použito několik vybraných metod (viz kap. 5.1). U všech vzorků byly také na počátku i na konci kultivace změřeny hodnoty pH, aby se posoudila míra okyselení piva kyselinou

mléčnou, vznikající jako produkt metabolismu probiotických bakterií. Pro kontrolu byl u všech piv proveden také paralelní experiment bez inokulace probiotiky.

Kultivační metodou nebyly v nenaočkovaných reálných vzorcích piv stanoveny žádné probiotické bakterie v čase $t = 0$ ani po týdenní kultivaci v čase $t = 7$ dní. Na Petriho miskách se nevyskytovaly žádné kolonie anaerobních mikroorganismů s charakteristikami kolonií probiotik. Metodou spektrofotometrického měření zákalu byly v časech $t = 0$ a $t = 7$ dní naměřeny pouze velmi nízké hodnoty absorbancí, konkrétně menší než 0,005, což odpovídá koncentracím biomasy řádově v 10^4 ml^{-1} v případě laktobacilů a 10^5 ml^{-1} v případě bifidobakterií, příp. 10^5 ml^{-1} při použití McFarlandovy zákalové stupnice. Tyto naměřené výsledky je ovšem nutno přisoudit spíše absorpci nečistot, které se nepodařilo odstranit při promývání mezi odstředováním v prováděném postupu. Za použití metody průtokové cytometrie byly při ředění $10\times$ stanoveny u všech vzorků hodnoty menší než 5 events/ μl , což odpovídá koncentracím do $5 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$.

Nejprve byl proveden experiment s jednotlivými kmeny probiotických bakterií. Koncentrace živých buněk probiotik c při inokulaci, tj. v čase $t = 0$, byly stanoveny kultivační metodou a jsou uvedeny v Tab. 17. Po 7 dnech kultivace bylo provedeno opět stanovení kultivační metodou, jehož výsledky jsou také v Tab. 17, a dále stanovení metodami spektrofotometrického měření zákalu a průtokové cytometrie, jejichž výsledky shrnuje Tab. 18.

Všechny výsledky koncentrace živých buněk se pohybují minimálně o řád výše, než koncentrace stanovené příslušnými metodami u kontrolních vzorků. Na základě kultivační metody lze konstatovat, že docházelo k poklesu viability buněk probiotik ve všech vzorcích u všech použitých kmenů. Nejmenší pokles byl zaznamenán u bakterie *B. bifidum*, u níž byly výsledné koncentrace po týdenní kultivaci maximálně o řád nižší oproti počátečním hodnotám. Například v reálném vzorku Pilsner Urquell došlo u zmíněného kmene pouze ke snížení koncentrace z hodnoty $(2,62 \pm 0,59) \cdot 10^7 \text{ CFU/ml}$ na $(2,43 \pm 0,49) \cdot 10^7 \text{ CFU/ml}$. U kmenů *L. acidophilus* a *B. breve* však bylo snížení viability mnohem podstatnější, v některých případech o tři až čtyři řády. Koncentrace laktobacilů po týdenní kultivaci v reálném vzorku Birell klesla z $(4,30 \pm 1,84) \cdot 10^5 \text{ CFU/ml}$ na $(1,80 \pm 0,14) \cdot 10^3 \text{ CFU/ml}$. Odlišné výsledky byly získány paralelně prováděnými metodami, u nichž byla koncentrace viabilních buněk po týdenní kultivaci ve většině případů také nižší než počáteční hodnota (stanovená kultivační metodou), avšak ani u jedné z těchto metod nebyl pozorován takový pokles viability jako u metody kultivační. Největší správnost výsledků je však předpokládána u kultivační metody, která totiž umožňuje nejvíce selektivní stanovení probiotických bakterií.

Tab. 17: Koncentrace viabilních buněk na počátku a na konci týdenní kultivace jednotlivých probiotických kmenů v reálných vzorcích pív (kultivační metoda)

	LA				BR				BI			
	$t = 0$		$t = 7$ dní		$t = 0$		$t = 7$ dní		$t = 0$		$t = 7$ dní	
	c	Δc	c	Δc	c	Δc	c	Δc	c	Δc	c	Δc
	[10 ⁵ CFU/ml]		[CFU/ml]		[10 ⁶ CFU/ml]		[CFU/ml]		[10 ⁷ CFU/ml]		[10 ⁷ CFU/ml]	
P	2,85	0,78	2,45 · 10³	0,21 · 10 ³	8,30	0,42	2,80 · 10⁴	0,14 · 10 ⁴	2,62	0,59	2,43	0,49
R	3,00	0,85	< 10³	–	11,20	1,70	< 10³	–	2,50	0,20	1,77	0,55
B	4,30	1,84	1,80 · 10³	0,14 · 10 ³	8,90	0,28	< 10³	–	2,44	0,17	1,88	0,17
S12	2,25	0,64	< 10³	–	7,60	1,41	7,33 · 10⁴	2,68 · 10 ⁴	2,90	0,08	1,52	0,06
S10	2,65	0,78	< 10³	–	16,20	4,81	4,45 · 10⁴	0,21 · 10 ⁴	2,28	0,11	1,13	0,47
SN	3,30	0,71	< 10³	–	6,80	3,68	< 10³	–	2,52	0,91	0,17	0,06
B12	2,60	0,57	< 10³	–	9,10	0,71	< 10³	–	1,88	0,85	0,54	0,03
B10	0,30	0,28	< 10³	–	6,70	0,42	< 10³	–	2,22	0,48	0,97	0,01
BN	0,25	0,07	< 10³	–	8,30	4,10	< 10³	–	5,80	1,92	2,37	0,33

U výsledků koncentrací viabilních buněk c z kultivační metody byly také určeny střední kvadratické chyby Δc , jejichž hodnoty jsou také uvedeny v Tab. 17.

Zkratky reálných vzorků pív jsou použity dle Tab. 8.

Tab. 18: Koncentrace viabilních buněk na konci týdenní kultivace jednotlivých probiotických kmenů v reálných vzorcích pív (metody průtokové cytometrie a spektrofotometrického měření zákalu)

	LA				BR				BI			
	FC		spektrofotometrie		FC		spektrofotometrie		FC		spektrofotometrie	
	podíl živých buněk	<i>c</i>	<i>c</i>	Δc	podíl živých buněk	<i>c</i>	<i>c</i>	Δc	podíl živých buněk	<i>c</i>	<i>c</i>	Δc
	[%]	$[10^5 \text{ ml}^{-1}]$	$[10^5 \text{ ml}^{-1}]$		[%]	$[10^6 \text{ ml}^{-1}]$	$[10^6 \text{ ml}^{-1}]$		[%]	$[10^6 \text{ ml}^{-1}]$	$[10^6 \text{ ml}^{-1}]$	
P	43,1	1,5	2,71	0,16	36,4	1,71	1,59	0,04	13,7	3,63	3,37	0,13
R	56,3	3,8	4,25	0,21	37,7	0,66	8,00	0,14	16,0	3,24	4,23	0,18
B	61,0	1,2	6,83	0,34	39,0	0,60	6,38	0,11	11,9	3,79	3,38	0,13
S12	47,4	1,5	8,71	0,44	37,7	0,61	6,03	0,10	19,2	3,59	5,30	0,23
S10	48,0	5,6	4,47	0,19	11,0	7,04	2,31	0,04	16,8	7,08	9,44	0,38
SN	60,9	5,1	7,38	0,34	39,8	0,35	8,11	0,14	15,1	3,28	5,24	0,21
B12	31,2	2,9	6,28	0,28	27,0	0,80	6,63	0,11	11,6	4,07	2,99	0,12
B10	41,0	5,1	21,39	0,94	34,2	1,10	7,07	0,17	36,3	3,57	9,46	0,38
BN	24,4	2,3	16,39	0,76	24,7	0,26	6,33	0,18	27,8	0,77	6,09	0,24

Podobně jako u kultivační metody byly u výsledků koncentrací viabilních buněk *c* z metody spektrofotometrického měření zákalu také určeny střední kvadratické chyby Δc , jejichž hodnoty jsou také uvedeny v Tab. 18.

Zkratky reálných vzorků pív jsou použity dle Tab. 8.

Výsledkem experimentu je tedy zjištění, že v průběhu týdenní kultivace použitých kmenů probiotických bakterií v chladu dochází většinou k podstatnému snížení koncentrace živých buněk. Tento pozorovaný jev je v souladu s výsledky získanými kultivací na mikrotitračních destičkách. Důvodem k poklesu viability probiotik může být již zmíněný vysoký obsah α -hořkých kyselin v použitých reálných vzorcích nebo obecně nevyhovující složení prostředí pív. Vliv na viabilitu buněk by mohla být také nízká teplota kultivace, neboť optimální růstová teplota všech použitých druhů bakterií se pohybuje kolem 40 °C [7]. Ovšem vzhledem k tomu, že růst probiotik neprobíhal při předchozích experimentech na mikrotitračních destičkách ani při teplotě 37 °C, nezdá se, že by teplota byla hlavním důvodem k pozorovanému poklesu viability u kultur.

Přestože k poklesu koncentrací viabilních buněk dochází podle kultivační metody ve všech případech, celkové snížení viability se liší podle použitého kmene. Z výsledků stanovených kultivační metodou se zdá být nejodolnějším kmenem *B. bifidum*, u kterého bylo snížení koncentrace buněk nejméně výrazné.

V Tab. 19 jsou uvedeny naměřené hodnoty pH všech vzorků na počátku a na konci kultivace. Zkratky reálných vzorků pív jsou použity dle Tab. 8. Je patrné, že téměř ve všech případech došlo k poklesu pH. U kontrolních (neočkovaných) vzorků je tento pokles zanedbatelný, zatímco v případě vzorků s probiotiky se jedná o poněkud výraznější snížení. Je to způsobeno metabolickou aktivitou probiotických bakterií, které produkují kyselinu mléčnou v rámci svého fermentačního metabolismu. Nejzřetelněji bylo zaznamenáno snížení u *B. bifidum*, kdy pH pokleslo v některých případech až o 0,14. Tato skutečnost potvrzuje výsledky kultivační metody, kdy u tohoto kmene byly na konci kultivace nejvyšší hodnoty koncentrace viabilních buněk. Celkově lze předpokládat, že pokud by tak silně neklesala viabilita kultury nebo kdyby docházelo k růstu biomasy, byl by pokles pH významnější.

Tab. 19: Změna pH vzorků při týdenní kultivaci jednotlivých kmenů probiotik

	$t = 0$	$t = 7$ dní			
		neočkováno	LA	BR	BI
P	4,66	4,63	4,55	4,55	4,52
R	4,74	4,72	4,70	4,69	4,67
B	4,72	4,69	4,69	4,62	4,61
S12	4,58	4,59	4,55	4,58	4,50
S10	4,57	4,56	4,54	4,54	4,50
SN	4,15	4,13	4,11	4,08	4,06
B12	4,47	4,47	4,43	4,43	4,42
B10	4,43	4,42	4,39	4,38	4,33
BN	4,89	4,89	4,89	4,85	4,77

Na základě dosažených výsledků studia kultivace jednotlivých kmenů v reálných vzorcích piva bylo ke kultivaci směsí vybráno pivo Pilsner Urquell, neboť při jeho použití docházelo v předešlém experimentu k poklesu viability u kultury probiotik v nejmenší míře. Podmínky kultivace byly shodné s podmínkami u kultivace jednotlivých kmenů. Výsledné hodnoty koncentrací viabilních buněk probiotik c (a u některých výsledků také střední

kvadratické chyby Δc) z experimentu týdenní kultivace směsí kmenů probiotických bakterií v reálných vzorcích jsou uvedeny v Tab. 20. Vzorky směsí probiotik jsou označeny písmennými zkratkami, v nichž „I“ značí *B. bifidum*, „R“ značí *B. breve* a „L“ značí *L. acidophilus*. Ke každému vzorku je také uvedena koncentrace znaménkem nerovnosti, kdy „>“ značí koncentrovanější kulturu a „<“ kulturu 1 000× zředěnou (viz kap. 4.10.4).

Tab. 20: Koncentrace viabilních buněk na konci týdenní kultivace směsí probiotických kmenů v reálných vzorcích pív

	$t = 0$		$t = 7$ dní					
	kultivace		kultivace		FC		spektrofotometrie	
	c [CFU/ml]	Δc [CFU/ml]	c [CFU/ml]	Δc [CFU/ml]	podíl živých buněk [%]	c [ml ⁻¹]	c [ml ⁻¹]	Δc [ml ⁻¹]
IR >	$3,56 \cdot 10^6$	$0,06 \cdot 10^6$	$2,14 \cdot 10^6$	$0,02 \cdot 10^6$	65,35	$9,33 \cdot 10^5$	$6,05 \cdot 10^6$	$2,02 \cdot 10^5$
IL >	$2,35 \cdot 10^7$	$0,21 \cdot 10^7$	$3,53 \cdot 10^6$	$0,05 \cdot 10^6$	68,16	$5,35 \cdot 10^6$	$5,20 \cdot 10^6$	$4,64 \cdot 10^5$
RL >	$1,75 \cdot 10^7$	$0,07 \cdot 10^7$	$4,04 \cdot 10^6$	$0,03 \cdot 10^6$	69,17	$3,35 \cdot 10^6$	$4,32 \cdot 10^6$	$3,89 \cdot 10^5$
IRL >	$1,80 \cdot 10^7$	$0,14 \cdot 10^7$	$3,12 \cdot 10^6$	$0,06 \cdot 10^6$	67,65	$4,65 \cdot 10^6$	$8,25 \cdot 10^6$	$7,51 \cdot 10^5$
IR <	$2,06 \cdot 10^3$	$0,31 \cdot 10^3$	$1,90 \cdot 10^3$	$0,14 \cdot 10^3$	89,51	$1,51 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^6$	$2,23 \cdot 10^5$
IL <	$2,10 \cdot 10^4$	$0,42 \cdot 10^4$	$3,35 \cdot 10^3$	$0,07 \cdot 10^3$	89,22	$3,35 \cdot 10^5$	$7,35 \cdot 10^5$	$1,14 \cdot 10^5$
RL <	$2,15 \cdot 10^4$	$0,07 \cdot 10^4$	$4,65 \cdot 10^3$	$0,21 \cdot 10^3$	87,65	$5,25 \cdot 10^5$	$8,32 \cdot 10^5$	$2,10 \cdot 10^5$
IRL <	$1,35 \cdot 10^4$	$0,21 \cdot 10^4$	$4,80 \cdot 10^3$	$0,14 \cdot 10^3$	83,55	$7,32 \cdot 10^5$	$5,25 \cdot 10^6$	$5,14 \cdot 10^5$

Výsledky kultivační metody udávají mírný pokles hodnot koncentrací viabilních buněk u všech vzorků. Dle kultivačního stanovení došlo u vzorků IR v obou ředěních ke snížení koncentrací pouze v rámci jednoho řádu, tj. např. u vzorku „IR <“ se koncentrace snížila z počáteční hodnoty $(2,06 \pm 0,31) \cdot 10^3$ CFU/ml na $(1,90 \pm 0,14) \cdot 10^3$ CFU/ml. U ostatních vzorků byl zaznamenán pokles koncentrací vždy o jeden řád, tj. např. u vzorku „IL >“ z hodnoty $(2,35 \pm 0,21) \cdot 10^7$ CFU/ml na $(3,53 \pm 0,05) \cdot 10^6$ CFU/ml. Také podle metody průtokové cytometrie byly výsledné koncentrace v některých případech nižší než koncentrace počáteční (stanovené kultivační metodou), avšak u zředěnějších vzorků byly naměřeny koncentrace zvýšené. Podobně je tomu také ve většině případů u metody spektrofotometrické. Je pravděpodobné, že k těmto vyšším hodnotám přispívají kromě probiotických bakterií i jiné mikroorganismy, popř. jiné částice, které v daných metodách poskytují odezvu. Mimoto lze pozorovat, že podle všech provedených metod byly výsledné koncentrace u zředěnějších vzorků nižší než u koncentrovanějších vzorků, dle kultivační metody o tři řády, dle zbylých dvou metod o jeden řád. Přestože však docházelo ke snížení viability, byla u všech vzorků po týdenní kultivaci stanovena poměrně vysoká koncentrace viabilních buněk.

Ve všech vzorcích pív s probiotickými kulturami byl zaznamenán pokles hodnot pH o 0,06–0,07, což je srovnatelné s výsledky kultivace jednotlivých kmenů, uvedenými v Tab. 19.

Porovnáním výsledků kultivace směsí kmenů (Tab. 17) s výsledky kultivace kmenů jednotlivých (Tab. 20) lze zkonstatovat, že směsi kmenů probiotik vykazují při týdenní kultivaci v pivu vyšší míru přežití než kmeny jednotlivé. Je možné, že mezi bakteriálními

kmeny existuje určitý mechanismus synergistického působení, a proto je výsledná ztráta viability směsných kultur nižší než u kultur samostatných kmenů. To potvrzuje také metoda průtokové cytometrie, pomocí které byly při kultivaci směsí probiotik naměřeny vyšší podíly živých buněk než při kultivaci jednotlivých kmenů (pro srovnání viz Tab. 18 a Tab. 20). Například při kultivaci v reálném vzorku piva Pilsner Urquell byla u samostatného kmene *B. bifidum* naměřena hodnota 13,7 % a u samostatného kmene *B. breve* 36,4 %, avšak u vzorku „IR >“, resp. „IR <“, obsahujících směs zmíněných kmenů, bylo stanoveno 65,35 %, resp. 89,51 % živých buněk.

5.4.3 Kultivace v plastových zkumavkách po dobu 9 týdnů

Vzhledem k zjištěné skutečnosti, že ve směsích kmenů probiotických bakterií dochází k menšímu poklesu viability buněk, byla u vzorků směsí probiotik provedena také dlouhodobější kultivace v reálném vzorku Pilsner Urquell po dobu 9 týdnů za stejných podmínek jako v předchozím experimentu. Byla také provedena kultivace kontrolního (neočkovaného) vzorku piva.

Výsledky kultivace kontrolního vzorku byly podobné jako u předchozího experimentu týdně kultivace (viz kap. 5.4.2).

Výsledné hodnoty koncentrací viabilních buněk probiotik c (a u některých výsledků také střední kvadratické chyby Δc) z experimentu 9týdně kultivace směsí kmenů probiotických bakterií v reálných vzorcích jsou uvedeny v Tab. 21. Vzorky směsí probiotik jsou označeny stejně jako v předchozím experimentu (viz kap. 5.4.2).

Tab. 21: Koncentrace viabilních buněk na konci 9týdně kultivace směsí probiotických kmenů v reálných vzorcích piva

	$t = 0$		$t = 9$ týdnů					
	kultivace		kultivace		FC		spektrofotometrie	
	c [CFU/ml]	Δc [CFU/ml]	c [CFU/ml]	Δc [CFU/ml]	podíl živých buněk [%]	c [ml ⁻¹]	c [ml ⁻¹]	Δc [ml ⁻¹]
IR >	$1,27 \cdot 10^6$	$0,29 \cdot 10^6$	$9,50 \cdot 10^3$	$0,07 \cdot 10^3$	18,5	$7 \cdot 10^4$	$2,06 \cdot 10^6$	$0,20 \cdot 10^6$
IL >	$1,49 \cdot 10^6$	$0,30 \cdot 10^6$	$8,70 \cdot 10^3$	$0,14 \cdot 10^3$	14,9	$7 \cdot 10^4$	$4,40 \cdot 10^6$	$0,46 \cdot 10^6$
RL >	$1,55 \cdot 10^5$	$0,78 \cdot 10^5$	$6,50 \cdot 10^2$	$0,35 \cdot 10^2$	19,3	$5 \cdot 10^4$	$6,02 \cdot 10^6$	$0,40 \cdot 10^6$
IRL >	$2,43 \cdot 10^6$	$0,35 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^3$	$0,14 \cdot 10^3$	9,6	$6 \cdot 10^4$	$1,04 \cdot 10^5$	$0,67 \cdot 10^5$
IR <	$1,83 \cdot 10^3$	$0,07 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^1$	$0,07 \cdot 10^1$	63,7	$2 \cdot 10^4$	$1,72 \cdot 10^7$	$0,13 \cdot 10^7$
IL <	$2,01 \cdot 10^3$	$0,33 \cdot 10^3$	$2,15 \cdot 10^1$	$0,11 \cdot 10^1$	67,0	$2 \cdot 10^4$	$3,12 \cdot 10^6$	$0,59 \cdot 10^6$
RL <	$3,50 \cdot 10^2$	$1,13 \cdot 10^2$	$2,50 \cdot 10^0$	$0,04 \cdot 10^0$	67,0	$2 \cdot 10^4$	$4,81 \cdot 10^5$	$2,10 \cdot 10^5$
IRL <	$2,00 \cdot 10^3$	$0,06 \cdot 10^3$	$7,50 \cdot 10^0$	$0,04 \cdot 10^0$	66,5	$2 \cdot 10^4$	$< 3,6 \cdot 10^6$	–

Z výsledků kultivační metody, uvedených v Tab. 21, je patrné, že u všech vzorků sice došlo k poklesu počtu viabilních buněk probiotik o dva až tři řády, ovšem určité koncentrace byly stanoveny i po 9 týdnech kultivace. Například u vzorku „IR >“ byl zaznamenán pokles z hodnoty $(1,27 \pm 0,29) \cdot 10^6$ CFU/ml na $(9,50 \pm 0,07) \cdot 10^3$ CFU/ml. Výsledky metody průtokové cytometrie nelze považovat za směrodatné, neboť hodnoty koncentrací buněk jsou

srovnatelné s hodnotami naměřenými u kontrolních (nenaočkovaných) vzorků. Podle spektrofotometrické metody došlo u všech vzorků k podstatnému nárůstu hodnot koncentrací živých buněk, avšak tyto výsledné hodnoty jsou zatíženy významnou chybou pocházející z výsledků viability průtokové cytometrie.

Pokud do výsledných koncentrací stanovených metodou spektrofotometrického měření zákalu nejsou započteny výsledky viability z průtokové cytometrie, pak lze na základě získaných hodnot usoudit, že u všech vzorků došlo k nárůstu biomasy. Naměřené absorbance totiž odpovídají koncentracím buněk vyšším než koncentracím počátečním (stanoveným kultivační metodou). Je zajímavé, že koncentrace biomasy na konci kultivace jsou srovnatelné u obou typů vzorků, tj. jak u koncentrovanějších kultur, tak u kultur 1 000× zředěných. To by odpovídalo mnohem silnějšímu nárůstu biomasy u vzorků očkovaných zředěnými inokuly. Je ovšem pravděpodobné, že naměřené absorbance byly způsobené nečistotami neodstraněnými v postupu metody (viz kap. 4.7.4), neboť hodnoty jsou blízké hodnotám stanoveným u kontrolních vzorků (viz kap. 5.4.2).

U všech vzorků byl zaznamenán pokles hodnot pH o 0,05–0,06, což je srovnatelné s výsledky týdenní kultivace jednotlivých kmenů (viz Tab. 19) i směsí (viz kap. 5.4.2).

Z porovnání krátkodobé, týdenní kultivace s kultivací dlouhodobou, prováděnou po dobu 9 týdnů, je patrné, že v průběhu dochází k poklesu koncentrace živých buněk probiotik (pro srovnání viz Tab. 20 a Tab. 21). Po 1 týdnu se koncentrace snížila nejvýše o jeden řád, po 9 týdnech bylo snížení významnější, až o tři řády. Taktéž viabilita stanovená metodou průtokové cytometrie byla při dlouhodobé kultivaci podstatně nižší. Po 1 týdnu bylo u vzorku „IR >“, resp. „IR <“ stanoveno 65,35 %, resp. 89,51 % živých buněk, kdežto po 9 týdnech bylo ve vzorcích stejné směsi stanoveno už jen 18,5 %, resp. 63,7 % živých buněk. Nicméně lze říci, že část buněk probiotických bakterií je schopna dlouhodobě přežít.

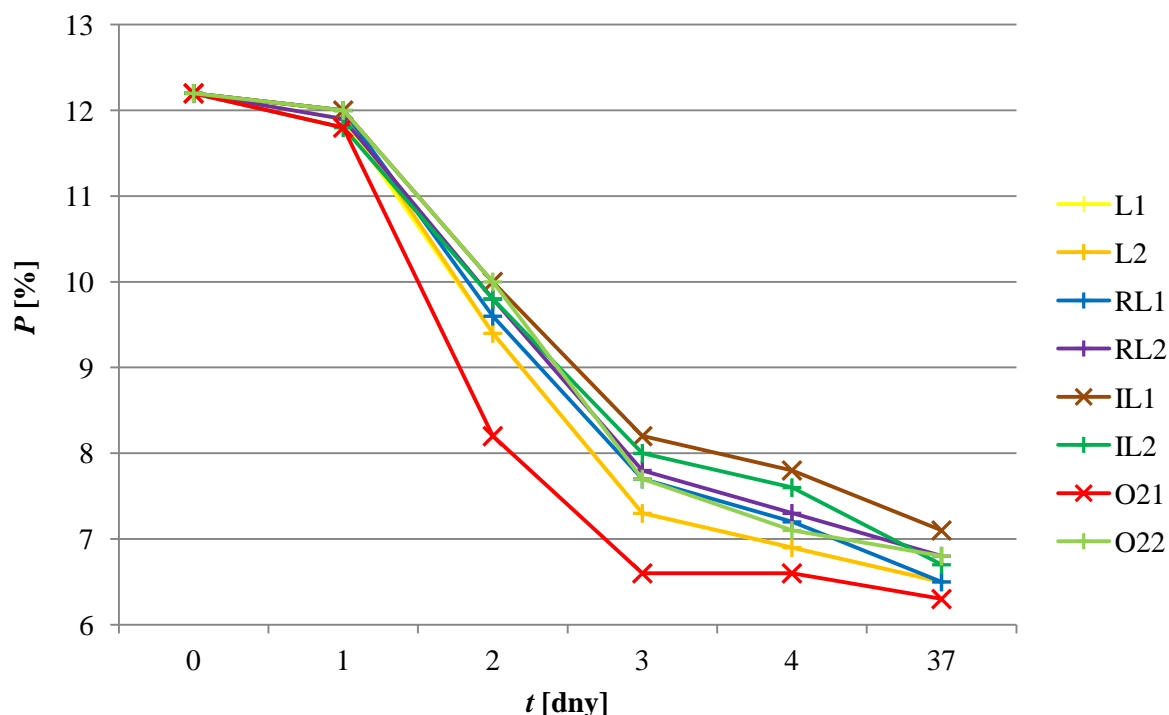
5.5 Charakterizace připraveného piva obohaceného probiotiky

V návaznosti na testování reálných vzorků českých spodně kvašených piv plzeňského typu bylo laboratorně připraveno svrchně kvašené pivo, které bylo současně se zakvácením inokulováno kmeny probiotických bakterií. Proces přípravy piva probíhal dle postupu uvedeného v kapitole 4.11. Ve třech várkách byly připraveny vzorky obsahující jak jednotlivé kmeny, tak i jejich směsi, přičemž ke každé várce byl připraven kontrolní (nenaočkovaný) vzorek. V textu, tabulkách a obrazech jsou pro jednotlivé vzorky připraveného piva použity zkratky, vysvětlené v Tab. 9.

S přihlédnutím k výsledkům předchozích experimentů bylo v postupu vaření aplikováno chmelení na nižší výslednou hořkost piva, konkrétně 15 IBU, což je přibližně dvakrát až třikrát méně v porovnání s hořkostí klasických českých piv plzeňského typu, která se pohybuje v rozmezí 35–45 IBU. Hlavní kvašení vzorků probíhalo po 3–4 dny (do ustálení hodnot EPM) při laboratorní teplotě a jejich následné dokvašování po 33–34 dní při teplotě 8 °C.

U všech vzorků byly sledovány hodnoty extraktu původní mladiny *P* v průběhu hlavního kvašení a následně byla změřena výsledná hodnota v konečném čase kvašení $t = 37$ dní. Hodnoty EPM přímo souvisejí s hodnotami koncentrace ethanolu, což vyplývá z Balingových vzorců, uvedených v rovnicích (1) a (2). Vzhledem k tomu, že alkohol vzniká v procesu

kvašení, lze říci, že míra poklesu hodnot EPM vypovídá o rychlosti kvašení piva. Příklady výsledků měření EPM jsou pro vzorky druhé várky uvedeny v grafu na Obr. 18. U ostatních vzorků byly výsledky obdobné, pro přehlednost grafu tudíž v Obr. 18 nejsou uvedeny. Je patrné, že pokles hodnot EPM nezávisí na obsahu probiotických bakterií. Spíše je pravděpodobné, že různorodost hodnot souvisí s množstvím kvasniční biomasy, která byla se zakvašenou mladinou převedena do kbelíků. Například u vzorku O21 je zřejmý strmější pokles EPM, což znamená rychlejší vzrůst koncentrací ethanolu, a tudíž intenzivnější kvašení.



Obr. 18: Hodnoty extraktu původní mladiny P v jednotlivých dnech hlavního kvašení a na konci celého kvašení. Zkratky jsou použity dle Tab. 9. V legendě jsou L1 a L2 značky vzorků s kmenem *L. acidophilus*, RL1 a RL2 vzorky se směsí *L. acidophilus* a *B. breve* a IL1 a IL2 vzorky se směsí *L. acidophilus* a *B. bifidum*. O21 a O22 jsou kontrolní vzorky bez probiotik.

Pro senzoričnou analýzu byly vyhrazeny dva vzorky piva obohaceného probiotiky, tj. IRL1 a IRL2, a dva kontrolní vzorky, tj. O33 a O34. U těchto vzorků byla stanovena kultivační metodou pouze koncentrace živých buněk probiotik na počátku a na konci kvašení, které jsou uvedeny v Tab. 22. U všech ostatních vzorků byla od počátku kvašení až do konce dokvašování, tzn. v průběhu 37 dní, měřena koncentrace živých buněk probiotik v různých časech, pokaždé kultivační metodou a ve vybraných časech také metodou spektrofotometrického měření zákalu a metodou průtokové cytometrie. Výsledky těchto měření jsou uvedeny v Tab. 22 a Tab. 23.

Z Tab. 22, v níž jsou shrnuty výsledky stanovení kultivační metodou, je zřejmé, že v celkové bilanci dochází k poklesu koncentrací viabilních buněk ve všech vzorcích s probiotickými bakteriemi, a to ve většině případů o dva řády. Přesto však byly na konci kvašení stanoveny poměrně vysoké koncentrace živých buněk probiotik. Například u vzorku piva I1, obsahujícího probiotickou kulturu *B. bifidum*, byl zaznamenán pokles koncentrace

živých buněk z $(2,67 \pm 0,11) \cdot 10^6$ CFU/ml na $(3,00 \pm 0,24) \cdot 10^4$ CFU/ml. Je zajímavé, že pouze u vzorků druhé várky, obsahujících laktobacily, došlo v průběhu hlavního kvašení nejprve k prudkému nárůstu koncentrace živých probiotik, což pak bylo následováno pozvolným poklesem hodnot. Například u vzorku L1 byla koncentrace v čase $t = 0$ rovna $(2,56 \pm 0,11) \cdot 10^6$ CFU/ml, v čase $t = 2$ dny potom $(8,50 \pm 0,14) \cdot 10^7$ CFU/ml, tj. o řád vyšší, a v čase $t = 4$ dny byla naměřena hodnota $(7,70 \pm 0,14) \cdot 10^7$ CFU/ml, tedy došlo k mírnému snížení. Dále koncentrace buněk u vzorku L1 klesaly až na výslednou hodnotu v čase $t = 37$ dní, která byla rovna $(4,45 \pm 0,50) \cdot 10^4$ CFU/ml.

V mnoha případech byl v průběhu celého kvašení mezi některými časy stanovení pozorován také mírnější nárůst hodnot koncentrací. Tento jev lze může být vysvětlen rozdíly mezi koncentrací buněk kvasinek v jednotlivých PET lahvích, ze kterých byly odebírány vzorky ke stanovení. Při stáčení vzorků totiž docházelo v různé míře k převedení části kvasniční biomasy do PET lahví, a tudíž následně při dokvašování existovaly rozdíly mezi rychlostmi fermentace v jednotlivých lahvích. V daném čase bylo tedy složení stejných vzorků v různých lahvích rozdílné. Vzhledem k tomu, že bylo pokaždé odebíráno z nové PET lahve, mohly rozdíly ve složení vzorků způsobovat různou míru přežití probiotických bakterií.

V Tab. 22 nejsou uvedeny výsledky kultivačního stanovení u kontrolních vzorků, neboť v žádném nebyly pozorovány kolonie anaerobních bakterií charakteristické pro probiotika.

Výsledné koncentrace viabilních buněk probiotik se u všech vzorků piv inokulovaných jednotlivými kmeny nebo dvousložkovými směsmi pohybují řádově v 10^4 CFU/ml. U vzorků obsahujících tříložkovou směs probiotik se podařilo docílit nejvyšších výsledných koncentrací, řádově v 10^5 CFU/ml. Maximální hodnota koncentrace viabilních buněk byla kultivační metodou stanovena u vzorku IRL4 a je rovna $(3,80 \pm 0,14) \cdot 10^5$ CFU/ml.

Naprosto odlišné výsledky byly získány metodami průtokové cytometrie a spektrofotometrie, jak je možno vidět v Tab. 23. U některých vzorků byly v průběhu či na konci kvašení stanoveny nižší hodnoty koncentrací živých buněk probiotických bakterií, u jiných naopak vyšší. Vysoké koncentrace byly stanoveny také u kontrolních vzorků. Je pravděpodobné, že použitá metoda vyhodnocení výsledků není vhodná pro vzorky obsahující kvasinky. Buňky kvasinek mají totiž větší rozměry, a tudíž k výsledné hodnotě absorbance přispívají mnohem více než buňky bakteriální. Velmi různorodé výsledky mohou být vysvětleny již zmíněnou skutečností, že při stáčení vzorků do PET lahví bylo do každé lahve převedeno jiné množství kvasniční biomasy. Větší správnost výsledků je tedy přisuzována výsledkům kultivační metody.

Ve všech časech, kdy bylo prováděno stanovení koncentrace buněk kultivační metodou, bylo také měřeno pH. Výsledky znázorňuje graf na Obr. 19. Je patrné, že dochází k výraznému poklesu pH v průběhu kvašení piva. Toto snížení je však způsobeno zejm. samotnou fermentací kvasinkami, což dokazuje podobnost výsledných hodnot pH u kontrolních i inokulovaných vzorků. Občasný nárůst hodnot pH mezi jednotlivými časy měření lze přisoudit opět různým koncentracím kvasniční biomasy v jednotlivých PET lahvích pro jeden vzorek. Čtyři ze šesti kontrolních vzorků vykazovaly rychlejší pokles pH než odpovídající vzorky s probiotiky. Je možné, že v inokulovaných vzorcích docházelo ke kompetici bakteriální a kvasniční kultury, v důsledku čehož neprobíhalo tak rychlé kvašení piva, a tudíž byl pokles pH mírnější.

Tab. 22: Koncentrace viabilních buněk probiotik v průběhu kvašení připraveného piva obohaceného probiotiky (kultivační metoda)

t	počátek kvašení ($t = 0$)	2 dny	konec hlavního kvašení ($t = 4$ dny, příp. $t = 3$ dny, vysvětleno níže)	7 dní	10 dní	14 dní	17 dní	24 dní	30 dní	konec dokvašování ($t = 37$ dní)
	c [CFU/ml]									
R1	$5,50 \cdot 10^4$	$3,48 \cdot 10^4$	$1,07 \cdot 10^4$	$8,30 \cdot 10^3$	$3,60 \cdot 10^4$	$1,93 \cdot 10^4$	$9,85 \cdot 10^3$	$1,02 \cdot 10^3$	$2,07 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^3$
R2	$6,50 \cdot 10^4$	$4,79 \cdot 10^4$	$2,10 \cdot 10^4$	$1,07 \cdot 10^4$	$4,45 \cdot 10^4$	$1,38 \cdot 10^4$	$5,25 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^3$	$2,20 \cdot 10^3$	$2,50 \cdot 10^4$
I1	$2,67 \cdot 10^6$	$2,31 \cdot 10^6$	$8,45 \cdot 10^5$	$3,76 \cdot 10^5$	$8,60 \cdot 10^4$	$5,50 \cdot 10^4$	$1,05 \cdot 10^4$	$9,20 \cdot 10^4$	$1,47 \cdot 10^4$	$3,00 \cdot 10^4$
I2	$4,69 \cdot 10^6$	$3,62 \cdot 10^6$	$7,00 \cdot 10^5$	$1,36 \cdot 10^5$	$1,70 \cdot 10^4$	$6,10 \cdot 10^4$	$7,75 \cdot 10^4$	$4,50 \cdot 10^4$	$1,44 \cdot 10^4$	$3,00 \cdot 10^4$
IR1	$2,05 \cdot 10^6$	$1,27 \cdot 10^6$	$2,95 \cdot 10^5$	$4,30 \cdot 10^4$	$4,95 \cdot 10^4$	$1,27 \cdot 10^4$	$8,65 \cdot 10^3$	$7,25 \cdot 10^3$	$4,65 \cdot 10^3$	$1,75 \cdot 10^4$
IR2	$1,91 \cdot 10^6$	$1,79 \cdot 10^6$	$3,70 \cdot 10^5$	$4,55 \cdot 10^4$	$1,55 \cdot 10^4$	$1,54 \cdot 10^4$	$1,80 \cdot 10^4$	$8,80 \cdot 10^3$	$4,60 \cdot 10^3$	$9,10 \cdot 10^3$
L1	$2,56 \cdot 10^6$	$8,50 \cdot 10^7$	$7,70 \cdot 10^7$	$1,70 \cdot 10^7$	$7,30 \cdot 10^6$	$5,50 \cdot 10^6$	$1,02 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^3$	$4,45 \cdot 10^4$
L2	$2,57 \cdot 10^6$	$9,35 \cdot 10^7$	$8,45 \cdot 10^7$	$1,35 \cdot 10^7$	$4,85 \cdot 10^6$	$3,50 \cdot 10^6$	$1,44 \cdot 10^6$	$3,00 \cdot 10^5$	$7,00 \cdot 10^3$	$2,15 \cdot 10^4$
RL1	$2,77 \cdot 10^6$	$1,15 \cdot 10^8$	$7,30 \cdot 10^7$	$9,50 \cdot 10^6$	$2,25 \cdot 10^6$	$5,50 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^5$	$1,15 \cdot 10^4$	$2,00 \cdot 10^4$
RL2	$2,72 \cdot 10^6$	$1,07 \cdot 10^8$	$9,20 \cdot 10^7$	$1,85 \cdot 10^7$	$2,80 \cdot 10^6$	$3,00 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^5$	$3,00 \cdot 10^5$	$5,50 \cdot 10^3$	$2,55 \cdot 10^4$
IL1	$3,56 \cdot 10^6$	$8,90 \cdot 10^7$	$5,80 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^7$	$1,80 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^6$	$8,50 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^4$	$3,10 \cdot 10^4$
IL2	$5,28 \cdot 10^6$	$9,70 \cdot 10^7$	$5,30 \cdot 10^7$	$4,50 \cdot 10^7$	$5,70 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^5$	$1,30 \cdot 10^4$	$3,60 \cdot 10^4$
IRL1	$4,30 \cdot 10^7$	–	–	–	–	–	–	–	–	$2,84 \cdot 10^5$
IRL2	$4,30 \cdot 10^7$	–	–	–	–	–	–	–	–	$2,42 \cdot 10^5$
IRL3	$4,50 \cdot 10^7$	–	$1,05 \cdot 10^7$	$1,12 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^5$	$1,50 \cdot 10^5$	$2,70 \cdot 10^5$	$3,55 \cdot 10^5$	$2,80 \cdot 10^5$	$2,07 \cdot 10^5$
IRL4	$4,00 \cdot 10^7$	–	$5,00 \cdot 10^6$	$1,85 \cdot 10^6$	$4,75 \cdot 10^5$	$1,75 \cdot 10^5$	$3,30 \cdot 10^5$	$6,50 \cdot 10^5$	$6,10 \cdot 10^5$	$3,80 \cdot 10^5$

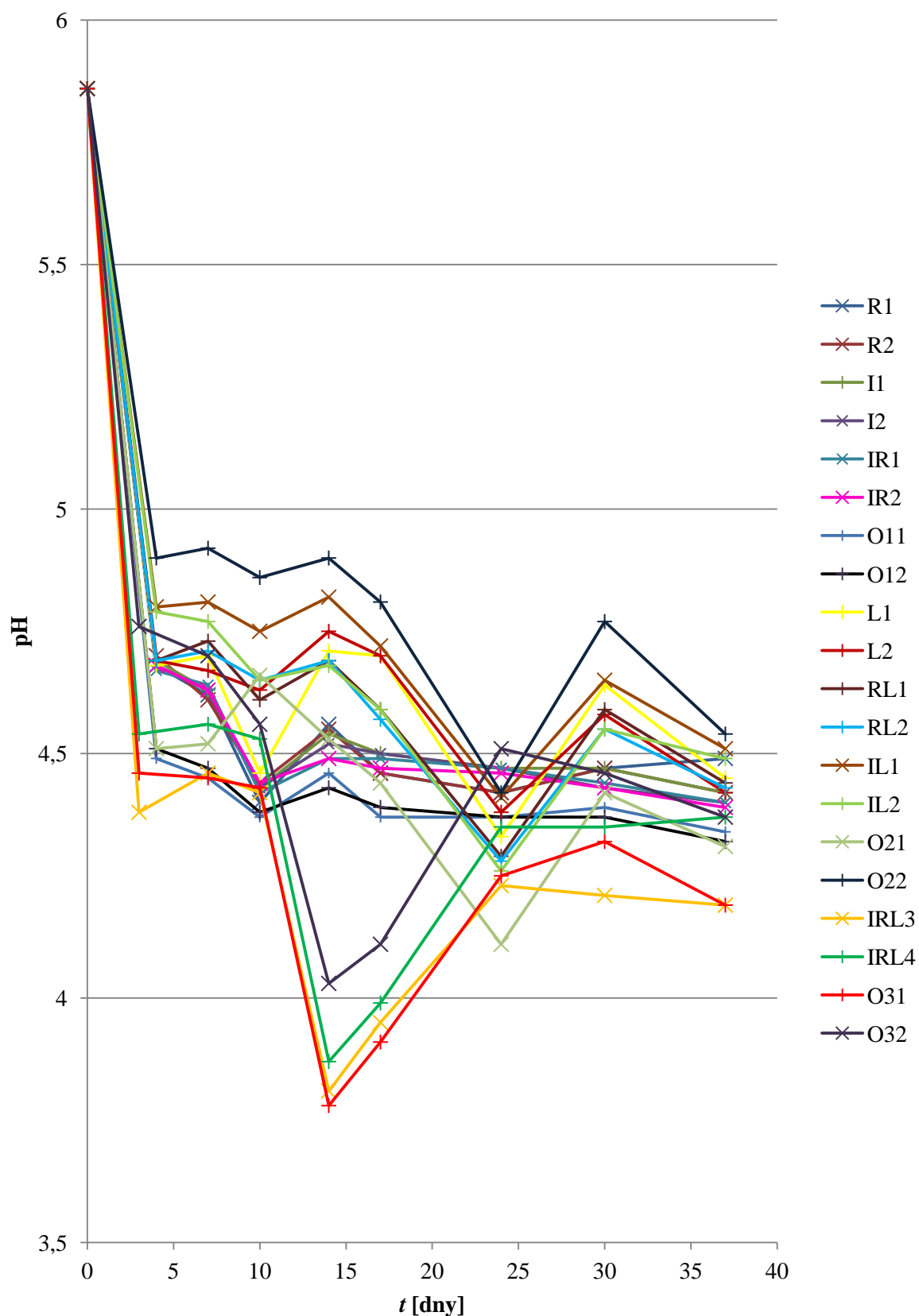
Zkratky jsou použity dle Tab. 9. V označení vzorků jsou použity zkratky „L“ pro *L. acidophilus*, „R“ pro *B. breve* a „I“ pro *B. bifidum*. „O1“, „O2“ a „O3“ je označení pro kontrolní vzorky bez probiotik, připravené k jednotlivým várkám.

Konec hlavního kvašení byl u všech vzorků v čase $t = 4$ dny kromě vzorků IRL, u kterých bylo hlavní kvašení ukončeno již v čase $t = 3$ dny. U všech hodnot byly určeny také střední kvadratické chyby Δc , které však nejsou v Tab. 22 uvedeny. Relativní chyby se u většiny měření pohybovaly do 35 %.

Tab. 23: Koncentrace viabilních buněk probiotik v průběhu kvašení připraveného piva obohaceného probiotiky (metody FC a měření zákalu)

<i>t</i>	10 dní			14 dní			17 dní			24 dní			30 dní			37 dní		
	FC		spektr.	FC		spektr.	FC		spektr.	FC		spektr.	FC		spektr.	FC		spektr.
	podíl živých buněk [%]	<i>c</i> [10 ⁷ CFU/ml]		podíl živých buněk [%]	<i>c</i> [10 ⁷ CFU/ml]		podíl živých buněk [%]	<i>c</i> [10 ⁷ CFU/ml]		podíl živých buněk [%]	<i>c</i> [10 ⁷ CFU/ml]		podíl živých buněk [%]	<i>c</i> [10 ⁷ CFU/ml]		podíl živých buněk [%]	<i>c</i> [10 ⁷ CFU/ml]	
R1	95,3	1,14	0,69				94,8	1,50	0,14	95,6	0,84	0,13				95,7	1,16	0,14
R2	94,5	1,17	0,97				95,5	0,76	0,09	95,8	1,25	0,13				95,9	1,50	1,19
I1	95,9	0,79	0,38				97,2	1,26	0,31	97,8	1,58	0,04				97,5	1,58	0,05
I2	96,6	0,98	1,02				97,5	1,52	0,38	97,6	1,02	0,04				97,6	1,73	0,45
IR1	95,2	1,09	1,00				96,2	1,43	6,35	96,6	1,42	0,88				96,7	1,18	8,59
IR2	95,3	1,18	6,19				96,3	1,56	6,54	96,5	1,39	0,87				96,5	1,18	9,05
O11	98,3	1,10	3,70				98,1	1,72	2,02	98,4	1,73	1,12				98,4	1,59	3,50
O12	98,2	0,92	3,66				98,2	1,33	3,23	98,0	1,49	1,12				98,4	1,61	9,33
L1	97,5	1,16	0,94				90,9	1,32	2,85				95,6	1,40	0,84	96,8	1,49	0,88
L2	93,0	1,04	0,93				94,6	1,01	0,99				95,3	1,26	0,63	94,1	1,30	7,23
RL1	94,8	1,04	28,22				95,8	1,13	18,31				95,7	1,12	16,40	96,2	1,21	16,26
RL2	95,0	1,18	33,04				95,7	1,09	20,60				96,4	1,41	9,85	97,3	1,50	151,46
IL1	97,1	1,23	19,73				96,6	1,26	14,27				96,5	1,41	11,71	97,2	1,30	124,96
IL2	95,9	1,16	30,81				95,9	1,19	20,34				96,2	1,26	11,49	96,2	1,26	126,43
O21	95,2	1,14	19,03				96,1	1,52	75,62				97,5	1,57	7,71	97,5	1,57	47,03
O22	97,3	1,43	17,84				97,0	1,24	13,36				96,4	1,22	8,16	96,4	1,22	137,30
IRL3				91,8	1,32	139,06				97,4	0,94	122,44				96,6	0,82	16,89
IRL4				98,7	2,78	22,53				98,6	1,90	18,78				95,7	1,65	12,89
O31				97,6	1,63	22,03				97,0	1,57	27,54				94,7	1,32	16,50
O32				98,9	2,53	47,68				99,0	2,22	22,36				95,2	1,99	9,93

Zkratky vzorků dle Tab. 9. U všech výsledků byla stanovena střední kvadratická chyba Δc , maximální hodnota relativní chyby byla 17,9 %.

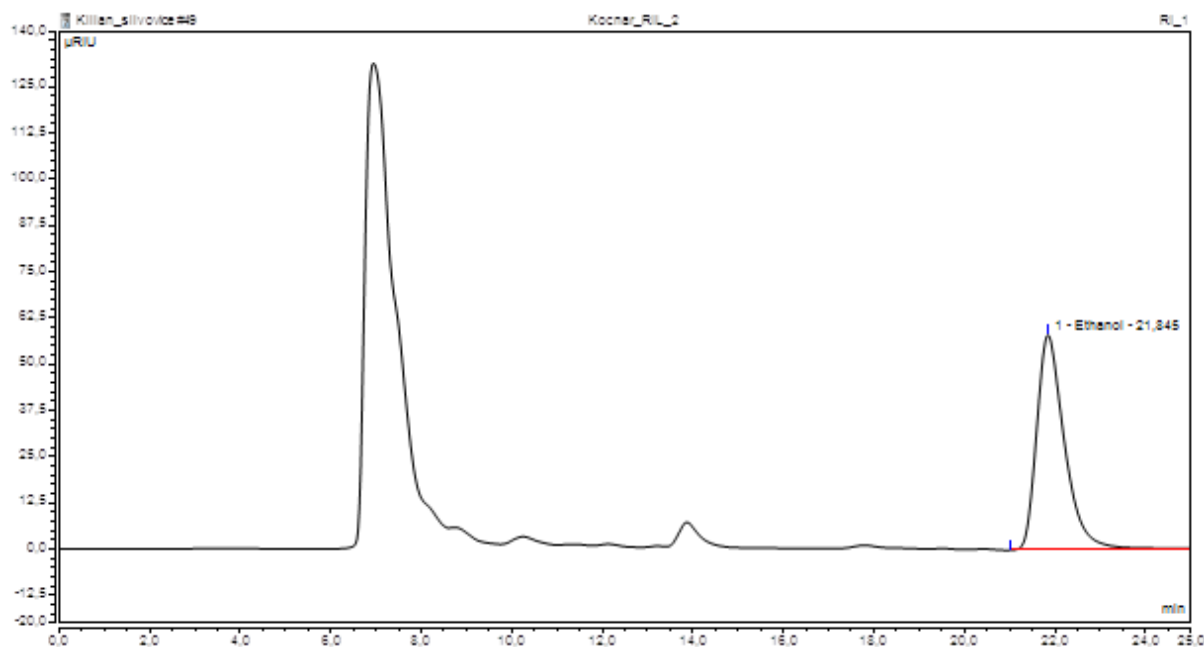


Obr. 19: Grafické znázornění hodnot pH v průběhu kvašení připravených vzorků piva. Zkratky jsou použity dle Tab. 9. Vzorky směsí probiotik jsou označeny písmennými zkratkami, v nichž „I“ značí *B. bifidum*, „R“ značí *B. breve* a „L“ značí *L. acidophilus*. „O1“, „O2“ a „O3“ jsou kontrolní vzorky k jednotlivým várkám.

Vzorky určené k senzorické analýze byly analyzovány také metodou HPLC-RI, na základě které byly sledovány koncentrace ethanolu a kyseliny mléčné. Chromatogram vzorku je uveden na Obr. 20. Výsledné objemové zlomky ethanolu φ jsou uvedeny v Tab. 24, kyselinu mléčnou se nepodařilo detekovat v žádném ze vzorků. Probiotické bakterie přítomné ve vzorcích IRL1 a IRL2 patrně nejsou obsaženy v takové koncentraci nebo nevykazují natolik vysokou metabolickou aktivitu, aby bylo možno detekovat zvýšenou koncentraci kyseliny mléčné. Koncentrace ethanolu se u jednotlivých vzorků liší nezávisle na obsahu probiotických bakterií, rozdílné hodnoty jsou patrně způsobeny různou koncentrací kvasniční biomasy v PET lahvích, ze kterých byly odebrány vzorky ke stanovení. V Tab. 24 jsou také uvedeny hodnoty koncentrace viabilních buněk probiotik c , stanovené kultivační metodou, a dále hodnoty pH a výsledného extraktu původní mladiny P , tj. EPM vzorků. Je zřejmé, že pH vzorků koreluje s EPM a s koncentrací ethanolu, ale naopak není vidět žádná souvislost s koncentracemi buněk. Tato skutečnost potvrzuje již zmíněnou hypotézu, že hodnoty jsou závislé spíše na množství kvasnic, převedených do daných PET lahví při stáčení mladého piva.

Tab. 24: Charakterizace vzorků piva IRL1, IRL2 a O33, O34

	c [CFU/ml]	pH	P [%]	φ [% obj.]
IRL1	$(2,84 \pm 0,13) \cdot 10^5$	4,19	6,6	6,02
IRL2	$(2,42 \pm 0,08) \cdot 10^5$	4,39	6,8	4,80
O33	0	4,29	6,7	5,29
O34	0	4,39	6,8	4,80



Obr. 20: Chromatogram vzorku IRL2 z metody HPLC-RI

Z výsledků stanovení koncentrací a viabilit buněk (ze stanovení kultivační metodou) vyplývá, že ve všech vzorcích došlo k poklesu koncentrace živých buněk probiotik až o tři řády. Může to být způsobeno dříve zmíněnými faktory, tj. teplotou kultivace, která byla nižší

než optimální teplota růstu použitých probiotik, nebo vysokou hořkostí piva. Sice bylo chmelení navrženo na výslednou hodnotu hořkosti 15 IBU, avšak je možné, že i při této hodnotě je v pivu obsaženo příliš velké množství antimikrobiálně působících α -hořkých kyselin, které mohou inhibovat růst použitých kmenů probiotických bakterií. Při přípravě piv typu Sour Ale je často aplikováno chmelení na velmi nízké hodnoty IBU, např. 3–8 IBU u německého Berliner Weisse nebo taktéž méně než 10 IBU u belgického piva Lambiek. Připravené pivo také mohlo obsahovat příliš nízké koncentrace pro probiotika esenciálních sloučenin. Možným vysvětlením snížení koncentrace je také použití kmenů neadaptovaných na prostředí piva.

Připravené probiotické pivo obsahovalo po 37 dnech kvašení viabilní probiotické bakterie v téměř všech případech řádově v 10^4 až 10^5 CFU/ml. Přestože potraviny označované jako probiotické mají obsahovat alespoň 10^6 buněk v ml [7], u piva jsou výsledky v řadu 10^4 až 10^5 CFU/ml poměrně příznivé, neboť při konzumaci 1 litru piva obohaceného probiotiky by tak byla aplikována dávka řádově 10^7 až 10^8 buněk. Navíc probiotika přijatá v pivu by mohla vykazovat vyšší míru přežití průchodu trávicím traktem, neboť jsou již před konzumací obsažena v tekutém, kyselém prostředí, a přechod do žaludeční šťávy tudíž nepředstavuje tak podstatnou změnu podmínek jako např. při aplikaci probiotik v kapslích v komerčních doplňcích stravy.

5.6 Porovnání použitých metod stanovení počtu a viability buněk

V předešlých experimentech bylo prováděno stanovení koncentrace a viability buněk probiotických bakterií třemi různými metodami, tj. metodou kultivační, metodou průtokové cytometrie a metodou spektrofotometrického měření zákalu. Protože bylo často prováděno paralelní stanovení více metodami, je možné provést porovnání a posouzení aplikovatelnosti metod.

Metoda spektrofotometrického měření zákalu se ukázala být velmi vhodná pro stanovení růstových křivek a pro studium růstu probiotik v prostředí modelových i reálných vzorků na mikrotitračních destičkách. Zde je možno paralelně provádět měření mnoha různých vzorků a výsledné absorbance lze přepočítat na koncentrace biomasy podle dříve stanovených kalibračních přímek. Spektrofotometrické stanovení je také vhodné při nutnosti rychlého a jednoduchého stanovení (či pouze odhadu) koncentrace biomasy, např. v inokulu.

S menšími výhodami byla spektrofotometrická metoda využita při měření zákalu ve větších objemech. Již absorbance 0,001 totiž po přepočtu znamená koncentraci až 10^5 , a tudíž nižší koncentrace nelze metodou detekovat. Za velmi nepřesné je nutno považovat stanovení koncentrací buněk bakterií ve vzorcích obsahujících také jiné mikroorganismy ve znatelných množstvích. Tyto totiž různou mírou přispívají k naměřeným hodnotám koncentrací a příspěvky jednotlivých přítomných druhů mikroorganismů lze odlišit pouze s využitím další metody, což je v mnohých případech nepřesné.

Metodou průtokové cytometrie sice je možno rozlišit prokaryotické a eukaryotické buňky, avšak je-li v kultuře přítomno více druhů bakterií, výsledek je velmi zkreslený. Výhodou metody je poměrně přesné stanovení viability kultury s využitím vitálního barvení propidiumjodidem.

V této práci byl největší úspěch zaznamenán při použití kultivační metody, jejíž výsledky mohou být považovány za nejsprávnější z použitých metod zejm. díky selektivitě způsobu stanovení. Kultivace byla prováděna v MRS médiu (příp. agaru), kdy jako kolonie probiotických bakterií byly vyhodnoceny pouze bílé, anaerobně rostoucí kolonie.

5.7 Senzorická analýza piva obohaceného probiotiky

Dva vzorky připraveného piva obohaceného probiotiky byly podrobeny senzorické analýze (zbylé dva vzorky z replikátů, původně zamýšlené pro senzorickou analýzu, byly ponechány jako zásoba, ale nakonec nebyly využity). Hodnocení proběhlo u vzorku piva inokulovaného tříšložkovou směsí obsahující kmeny *L. acidophilus*, *B. breve* a *B. bifidum* (IRL2) a u kontrolního vzorku neinokulovaného piva (O34). Tyto vzorky analyzovalo celkem 23 proškolených hodnotitelů, přičemž jednotlivé vzorky byly označeny A a B bez jakékoli bližší specifikace. Analýza probíhala na základě dotazníku, který uvádí Příloha 3. Počet hodnotitelů podle pohlaví a věku je uveden v Tab. 25. Průměrný věk souboru hodnotitelů byl ($26,5 \pm 3,2$) let. Mezi hodnotiteli bylo 26 % mužů a 74 % žen, z nichž většina byli nekuřáci (87 %).

Tab. 25: Hodnotitelé při senzorické analýze

	věk				pohlaví		kouření	
	20–24	25–29	30–34	34–39	muž	žena	kuřák	nekuřák
počet hodnotitelů	6	14	2	1	6	17	3	20



Obr. 21: Vzorky piva, hodnocené v senzorické analýze (vlevo vzorek se směsí všech tří použitých probiotik – IRL2, vpravo kontrolní vzorek bez probiotik – O34)

Při senzorické analýze bylo sledováno několik organoleptických vlastností piva, jejichž zhodnocení bylo provedeno podle intenzity, popř. přijatelnosti na vodorovné ose od 0 do 10. Ze všech získaných hodnocení dané vlastnosti byl následně vypočten průměr, představující výsledné hodnocení. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 26 a v grafech na Obr. 22 a Obr. 23. Vzorek se směsí všech tří použitých probiotik je označen IRL2 a kontrolní vzorek bez probiotik O34.

Tab. 26: Výsledky senzorické analýzy

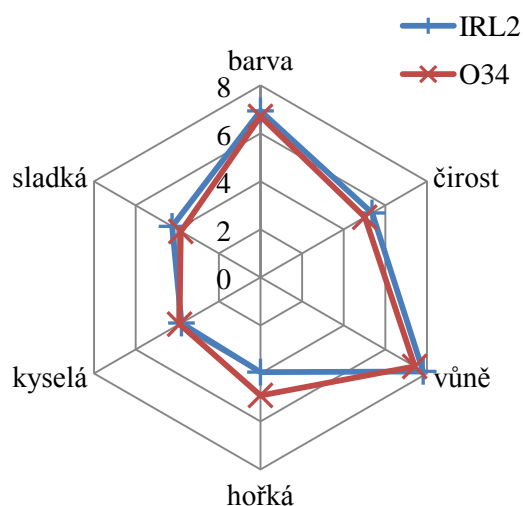
	barva	čirost	vůně	hořká	kyselá	sladká	podobnost pivu	celkové hodnocení
IRL2	6,93	5,37	7,83	3,94	3,80	4,25	5,73	6,98
O34	6,70	5,01	7,42	4,91	3,89	3,83	6,14	7,17

Z vizuálních vlastností se hodnotila barva (0 – bez barvy, 10 – velmi intenzivní zbarvení) a čirost piva (0 – čiré, 10 – zakalené). Vzorek obsahující probiotika měl podle hodnotitelů větší barevnou intenzitu a větší zákal, než vzorek kontrolní. Zákal může být způsoben obsaženými probiotiky. Vůně (0 – nevyhovující, 10 – vynikající) byla hodnocena lépe u vzorku s probiotiky.

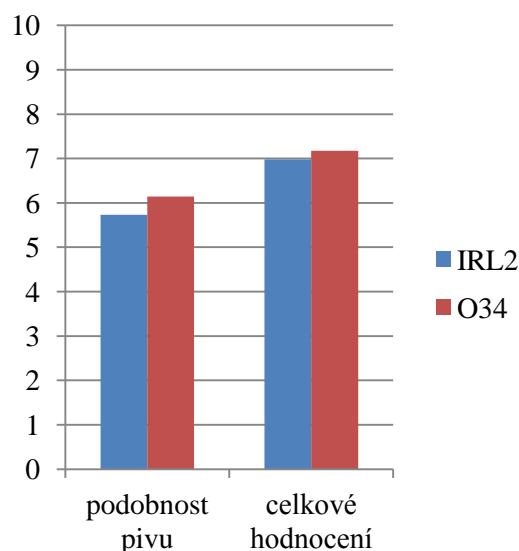
Dále byly analyzovány tři druhy chutí, tj. hořká, kyselá a sladká chuť podle intenzity (0 – neznatelná, 10 – velmi intenzivní). Silnější hořkost a silnější kyselost byla hodnotiteli zaznamenána u vzorku bez probiotik, silnější sladkost naopak u vzorku obohaceného probiotiky. Silnější sladkost u vzorků s probiotiky může být způsobena menší mírou fermentace v důsledku již zmíněné kompetice dvou přítomných kultur, tj. kvasniční a probiotické. V důsledku může u těchto vzorků docházet také k mírnějšímu poklesu pH, a tím ke slabší kyselosti. Z Tab. 24 však vyplývá, že hodnoty pH byly u obou analyzovaných vzorků shodné.

Vedle zmíněných tří základních chutí byla v analýze hodnocena také přítomnost cizích chutí a příchutí, příp. jejich intenzita (0 – neznatelná, 10 – velmi intenzivní). V obou vzorcích bylo rozpoznáno několik cizích chutí či příchutí. U obou piv uvedlo několik hodnotitelů karamelovou příchut' (s průměrnou intenzitou 4 u probiotického, 2 u kontrolního) a medovou příchut' (s intenzitou 7 u probiotického, 2 až 7 u kontrolního). V pivu s probiotiky byly dále rozpoznány následující chutě (v závorce vždy intenzita): ovocná příchut' (2), hořká pachut' (5) a svíravá chuť (5). V kontrolním vzorku byla detekována vůně vitaminových doplňků (5), dále cizí hořká chuť (3), pachut' zvětrání (3) a máselná chuť (2).

Nakonec bylo provedeno celkové zhodnocení vzorků piva, konkrétně jejich podobnost klasickému svrchně kvašenému pivu (0 – z hlediska sensoriky naprosto odlišné, 10 – z hlediska sensoriky zcela odpovídající klasickému svrchně kvašenému pivu) a jejich celková přijatelnost (0 – nevyhovující, 10 – vynikající). Podle výsledků senzorické analýzy je klasickému svrchně kvašenému pivu podobnější vzorek neobsahující probiotika, který je zároveň hodnocen celkově o něco lépe než vzorek obohacený probiotiky. Je však nutné podotknout, že nejen celkové hodnocení, ale také hodnocení jednotlivých vlastností obou piv se liší jen velmi málo, nejvýše o 0,97 stupně (u hořké chuti). Pozitivním zjištěním tedy je, že připravené pivo obohacené o probiotika, které by mělo mít příznivý vliv na zdraví konzumenta, je podle provedené senzorické analýzy hodnoceno jako chuťově přijatelné.



Obr. 22: Hodnocení jednotlivých organoleptických vlastností vzorků



Obr. 23: Celkové hodnocení vzorků (IRL2 je vzorek s probiotiky, O34 vzorek kontrolní)

5.8 Návrh optimální technologie přípravy piva obohaceného probiotiky

Na základě dosažených výsledků lze provést diskuzi volby optimální technologie přípravy piva obohaceného probiotiky.

Vzhledem ke skutečnostem, že u všech připravených vzorků piva došlo k poklesu koncentrací živých buněk probiotik (většinou o dva řády CFU/ml) a že se podařilo připravit pivo s koncentrací nejvýše $(3,80 \pm 0,14) \cdot 10^5$ CFU/ml, je nutné pro nalezení zcela optimální technologie provést další experimenty. Cílem takových experimentů by měla být příprava piva obohaceného probiotiky, které bude koloidně, senzoricky a biologicky stabilní a bude ve stanovené době expirace obsahovat alespoň 10^6 viabilních buněk probiotických bakterií na mililitr.

Pro dosažení tohoto cíle by mohlo být experimentálně otestováno očkování inokuly s větší koncentrací biomasy, popř. v optimálnějších čase exponenciální fáze. S přihlédnutím k tomu, že u naprosté většiny vzorků došlo ke snížení koncentrací živých buněk probiotik právě o dva řády CFU/ml nezávisle na počátečních hodnotách koncentrace, je pravděpodobné, že při inokulaci kulturou obsahující větší množství biomasy by bylo dosaženo také vyšších výsledných koncentrací. U připraveného piva s probiotiky by bylo také třeba provést studii biologické stability, v níž by byla sledována míra přežití probiotických bakterií v různých časech po uplynutí doby dokvašování.

Důležitým faktorem je také teplota dokvašování, která by u svrchního kvašení měla být v rozmezí 12–14 °C [59]. Tato teplota by mohla být pro kultivaci probiotických bakterií vhodnější, neboť jejich optimální růstové teploty jsou poměrně vysoké. Je tedy možné, že v případě dokvašování při zmíněných teplotách by byly získány vyšší výsledky koncentrací viabilních buněk probiotik. Obecně lze říci, že zvolené svrchní kvašení je pro přípravu piva obohaceného probiotiky vhodnější než kvašení spodní, neboť jak hlavní fermentace, tak dokvašování probíhají u svrchních kvasinek *S. cerevisiae* při vyšších teplotách.

Aby byl zmírněn pokles viability probiotických bakterií, bylo by vhodné optimalizovat postup chmelení, a sice z hlediska typu použitého chmele a především výsledného obsahu antimikrobiálně působících α -hořkých kyselin. Při chmelení na nižší hodnoty IBU by mohlo být dosaženo vyšších výsledných koncentrací probiotik, avšak určitá hořkost je důležitá pro organoleptické vlastnosti piva [59]. V rámci optimalizace přípravy piva obohaceného probiotiky by tudíž bylo vhodné nalézt optimální koncentrace hořkých látek (optimální hodnoty IBU), co nejméně snižující viabilitu probiotik, ale zároveň co nejvíce vyhovující v senzorické analýze piva. V tomto ohledu by také mohlo být velmi přínosné provést studii vlivu koncentrace α -hořkých kyselin na růstové křivky probiotických bakterií. Experiment by mohl probíhat např. podobným způsobem, jakým byl v této práci hodnocen vliv ethanolu, tj. v modelových vzorcích obsahujících MRS médium s různými koncentracemi vybraných α -hořkých kyselin chmele. Také by mohly být připraveny další vzorky piv s přídavkem probiotik, které by byly chmeleny na různé hodnoty IBU; u takových vzorků by pak byla sledována koncentrace viabilních buněk probiotik v průběhu kvašení a následně by vzorky byly podrobeny senzorické analýze. Na základě výsledků popsanych experimentů by mohla být nalezena optimální hořkost piva obohaceného probiotiky v jednotkách IBU.

Při přípravě piva obohaceného probiotiky by kromě zmíněných faktorů měl být kladen důraz na výběr vhodného kmene probiotické bakterie. Pravděpodobně vhodnější je použití bakterií rodu *Lactobacillus*, jehož některé druhy (resp. kmeny) se v pivu vyskytují jako kontaminanty [7]. Například při přípravě různých německých a belgických stylů piv typu Sour Ale se uplatňuje bakteriální druh *L. delbrueckii* [59]. U rodu *Bifidobacterium* může být problémem striktně anaerobní povaha druhů. Izolace vhodných kmenů, které jsou přizpůsobeny k růstu v prostředí piva, a jejich následné použití by mohlo poskytnout příznivější výsledky oproti kmenům použitým v této práci. Tyto se totiž nemusí být schopny na prostředí piva adaptovat v dostatečné míře, v důsledku čehož může docházet k podstatným ztrátám viability. Je také možné, že lepších výsledků by bylo dosahováno při použití směsí kmenů probiotických bakterií. V provedených experimentech byl totiž ve vzorcích se směsmi kmenů laktobacilů a bifidobakterií zaznamenán menší pokles koncentrací živých buněk, než ve vzorcích s kmeny jednotlivými.

Podle dosažených výsledků a na základě informací z použité literatury lze předpokládat, že vhodný technologický postup pro přípravu piva obohaceného probiotiky by se skládal z následujících kroků:

1. příprava mladiny s nízkým obsahem hořkých látek chmele (hořkost nižší než 15 IBU),
2. inokulace mladiny vhodnými probiotickými kulturami o dostatečné koncentraci biomasy (alespoň 10^8 CFU/ml) a ve vhodném čase exponenciální fáze růstu,
3. svrchní kvašení mladiny při laboratorní teplotě s dokvašováním při teplotách 12–14 °C.

Pro formulaci konkrétních technologických parametrů a bližších specifikací procesu by však bylo nutné provést rozsáhlejší optimalizační studii.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala přípravou piva obohaceného o probiotické bakterie a studiem jeho biologické stability, tzn. sledováním koncentrace a viability buněk probiotik. V experimentech byly použity kmeny probiotických bakterií *L. acidophilus*, *B. breve* a *B. bifidum*.

Velká část práce byla věnována optimalizaci a srovnání metod stanovení počtu a viability buněk probiotických bakterií. Z dostupných metod byla k optimalizaci vybrána metoda kultivační a dále dvě metody instrumentální, tj. průtoková cytometrie a spektrofotometrické měření zákalu. Metody byly u některých experimentů použity paralelně za účelem následného porovnání výsledků a posouzení aplikovatelnosti metod za experimentálních podmínek. Bylo zjištěno, že obecně nejvhodnějším způsobem stanovení sledovaných parametrů je za daných podmínek kultivační metoda, neboť je nejvíce selektivní, a tudíž i v komplexních vzorcích poskytuje nejsprávnější výsledky. Hodnoty stanovené paralelně metodou průtokové cytometrie a spektrofotometrickým měřením zákalu nebyly s hodnotami získanými kultivační metodou ve většině případů srovnatelné. Spektrofotometrická metoda se však ukázala být velmi vhodná pro měření růstových křivek na mikrotitračních destičkách pomocí absorbančního ELISA readeru. Průtoková cytometrie byla použitelná pro posouzení viability kultury v případech nepříliš komplexních vzorků.

V experimentální části práce byly nejprve naměřeny růstové křivky jednotlivých kmenů použitých probiotických bakterií za účelem stanovení doby trvání jejich růstových fází. U všech bakterií bylo dosaženo stacionární fáze růstu již v průběhu prvního dne kultivace. V případě bakterie *L. acidophilus* byla výsledná koncentrace biomasy ve stacionární fázi v řádu 10^7 ml^{-1} , v případě bakterií *Bifidobacterium* spp. se výsledné koncentrace pohybovaly v řádu 10^8 ml^{-1} . Následně byl hodnocen vliv různých koncentrací ethanolu na růst probiotik v tekutém MRS médiu. Koncentrace ethanolu byly voleny tak, aby odpovídaly objemovým zlomkům alkoholu v různých druzích piv. Bylo zjištěno pouze drobné ovlivnění výsledných hodnot koncentrací buněk u všech kmenů probiotik, konkrétně docházelo s rostoucí koncentrací ethanolu k mírnému poklesu množství biomasy, avšak průběh růstových křivek se jiným způsobem nezměnil. Všechny tyto experimenty byly provedeny při inokulačních poměrech 5 % a 10 %, avšak tyto poměry inokulace neměly významný vliv na dosažené výsledky.

Dále byl studován růst probiotik v 9 reálných vzorcích piv plzeňského (českého) typu. Na mikrotitračních destičkách probíhala kultivace podobně jako v předchozích experimentech, tzn. při teplotě 37 °C po dobu do 24 h. Nedocházelo zde k podstatnějšímu nárůstu koncentrací biomasy u žádného kmene probiotických bakterií.

S reálnými vzorky byly provedeny také další experimenty, kdy byla studována dlouhodobá kultivace jednotlivých kmenů probiotik a jejich směsí (směsi byly kultivovány pouze ve vzorku Pilsner Urquell) v plastových zkumavkách po dobu 1 týdne a poté 9 týdnů. Ukázalo se, že po 1 týdnu sice dochází k poklesu koncentrací viabilních buněk probiotik ve všech případech, ovšem u směsných kultur byl tento pokles obecně mnohem mírnější. V případě jednotlivých kmenů byl zaznamenán podstatnější pokles koncentrací o tři až čtyři

řády. Výjimkou je bakterie *B. bifidum*, u které bylo snížení koncentrací nejmenší, přibližně o jeden řád. Také v případě směsí kmenů bylo snižování koncentrace nejvýše o jeden řád. Směsi probiotik byly dále kultivovány v pivu Pilsner Urquell po dobu 9 týdnů. Po této době došlo již k silnějšímu poklesu koncentrací viabilních buněk, konkrétně až o tři řády. Ve všech případech však bylo možné na konci kultivace stanovit určitou koncentraci živých buněk probiotik.

V návaznosti na předchozí experimenty byly připraveny vzorky světlého, svrchně kvašeného piva obohaceného probiotiky a u tohoto piva byla sledována biologická stabilita v průběhu celého kvašení, které trvalo celkem 37 dní. Byly připraveny vzorky obsahující jednotlivé kmeny i jejich směsi a také kontrolní vzorky, do kterých nebyla probiotika očkovaná. U naprosté většiny vzorků s probiotiky docházelo v konečné bilanci k poklesu koncentrace viabilních buněk probiotických bakterií právě o dva řády, pouze u dvou vzorků byl pokles pouze o jeden řád či v rámci řádu. U žádného vzorku nebyl pozorován růst probiotických kultur v konečné bilanci. Nejvyšší koncentrace viabilních buněk na konci kvašení byla zjištěna u vzorku IRL, obsahujícího tříložkovou směs všech použitých kmenů probiotik. Tato koncentrace byla stanovena na $(3,80 \pm 0,14) \cdot 10^5$ CFU/ml. Oproti hodnotě 10^6 CFU/ml, která je minimální koncentrací vyžadovanou pro probiotický charakter potraviny, se sice jedná o hodnotu nižší, ovšem objem konzumovaného piva bývá mnohem vyšší než u jiných probiotických potravin, např. u probiotického jogurtu. Probiotika obsažená v pivu navíc mohou vykazovat menší ztrátu viability při průchodu trávicím traktem, poněvadž jsou již ve chvíli konzumace přítomny v kyselém a kapalném prostředí.

Jeden vzorek piva obohaceného probiotiky a jeden kontrolní vzorek byly společně podrobeny senzorické analýze. Vyšší kyselost byla zjištěna u vzorku kontrolního, který byl však ve výsledku celkově lépe hodnocen oproti vzorku s probiotiky. Na uzavřeném intervalu od 0 do 10 byl vzorek s probiotiky hodnocen stupněm 6,98 a vzorek kontrolní stupněm 7,17. Nutno poznamenat, že výsledná hodnocení jednotlivých sledovaných vlastností si byla u obou vzorků vždy velmi podobná. Nejvyšší rozdíl mezi výslednými hodnoceními vzorků byl 0,97 u hořkosti. Pivo s probiotiky bylo tedy konzumenty přijato velmi dobře.

Čtyři vzorky byly analyzovány metodou HPLC-RI, ve které byly sledovány dva analyty, konkrétně ethanol a kyselina mléčná. Koncentrace ethanolu v obou senzoricky analyzovaných vzorcích byla stanovena na 4,80 % obj., u dalších dvou vzorků byly stanoveny hodnoty vyšší, konkrétně 5,29 % obj. (vzorek kontrolní) a 6,02 % obj. (vzorek s probiotiky). Kyselinu mléčnou nebylo možné detekovat ani u jednoho ze vzorků.

Na základě dosažených výsledků byla diskutována optimální technologie přípravy piva obohaceného probiotiky. Technologie by měla zahrnovat přípravu mladiny s nízkým obsahem hořkých látek chmele (hořkost nižší než 15 IBU). Inokulace této mladiny vhodnými probiotickými kulturami o dostatečné koncentraci biomasy (alespoň 10^8 CFU/ml) by měla proběhnout ve vhodném čase exponenciální fáze růstu. Na základě dosažených výsledků je možné předpokládat, že by bylo vhodné použití směsi kmenů probiotických bakterií. Svrchní kvašení mladiny by mělo být prováděno při laboratorní teplotě s dokvašováním při teplotách 12–14 °C. Pro formulaci konkrétních technologických parametrů a bližších specifikací procesu by však bylo nutné provést rozsáhlejší optimalizační studii.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 1989, **66**(5), 365–378.
- 2 FAO/WHO. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Córdoba (Argentina), 2001.
- 3 HILL, C., F. GUARNER, G. REID, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014, **11**(8), 506–514. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66. ISSN 1759-5045. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>
- 4 MCCracken, V. J. a R. G. LORENZ. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Microreview. *Cellular Microbiology*. 2001, **3**(1), 1–11. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00090.x. ISSN 1462-5814. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-5822.2001.00090.x>
- 5 FABBIANO, S., N. SUÁREZ-ZAMORANO a M. TRAJKOVSKI. Host–Microbiota Mutualism in Metabolic Diseases. *Frontiers in Endocrinology*. 2017, **8**. DOI: 10.3389/fendo.2017.00267. ISSN 1664-2392. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00267/full>
- 6 SANDERS, M. E., D. MERENSTEIN, C. A. MERRIFIELD a R. HUTKINS. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*. 2018, **43**(3), 212–225. DOI: 10.1111/nbu.12334. ISSN 14719827. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/nbu.12334>
- 7 GÖRNER, F. a Ľ. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľov: princípy mikrobiológie požívateľov, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívateľmi*. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967-0649-7.
- 8 DE SIMONE, C. The Unregulated Probiotic Market. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. [article in press] 2018. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.01.018. ISSN 15423565. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356518300843>
- 9 FULLER, R. *Probiotics: The scientific basis*. Springer Netherlands, 1992. ISBN 978-94-011-2364-8.
- 10 HUTKINS, R. W. *Microbiology and technology of fermented foods*. Second edition. Ames (Iowa): Blackwell Pub., 2006. ISBN 978-081-3800-189.
- 11 BIAVATI, B., M. VESCOVO, S. TORRIANI a V. BOTTAZZI. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 2000, **50**(2), 117–131.

- 12 Lending a helping hand: Can probiotics treat inflammatory bowel disease?. *The Biochemist Blog* [online]. London: Biochemical Society, 2017 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://thebiochemistblog.com/2017/05/26/lending-a-helping-hand-can-probiotics-treat-inflammatory-bowel-disease/>
- 13 SALMINEN, S., A. von WRIGHT, S. LANTHIEN a A. OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, c2012. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- 14 FRIC, P. Probiotics and prebiotics — renaissance of a therapeutic principle. *Open Medicine*. 2007, **2**(3), 237–270. DOI: 10.2478/s11536-007-0031-5. ISSN 2391-5463. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/med.2007.2.issue-3/s11536-007-0031-5/s11536-007-0031-5.xml>
- 15 FRIČ, P. Střevní mikroflóra, gastrointestinální ekosystém a probiotika. *Medicína pro praxi*. 2010, **7**(11), 408–414.
- 16 FRANK, D. N a N. R. PACE. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2008, **24**(1), 4–10. DOI: 10.1097/MOG.0b013e3282f2b0e8. ISSN 0267-1379. Dostupné také z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001574-200801000-00003>
- 17 VRIEZE, A., F. HOLLEMAN, E. G. ZOETENDAL, W. M. DE VOS, J. B. L. HOEKSTRA a M. NIEUWDORP. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*. 2010, **53**(4), 606–613. DOI: 10.1007/s00125-010-1662-7. ISSN 0012-186X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-010-1662-7>
- 18 MCFARLAND, L. V. Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009, **12**(4), 193–207. DOI: 10.1080/08910600050216183. ISSN 1651-2235. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08910600050216183>
- 19 FIJAN, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014, **11**(5), 4745–4767. DOI: 10.3390/ijerph110504745. ISSN 1660-4601. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/5/4745>
- 20 GEORGE, F., C. DANIEL, M. THOMAS, et al. Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2018, **9**. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02899. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02899/full>
- 21 DUAR, R. M., X. B. LIN, J. ZHENG, et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017, **41**(Supp_1), S27–S48. DOI: 10.1093/femsre/fux030. ISSN 1574-6976. Dostupné také z: http://academic.oup.com/femsre/article/41/Supp_1/S27/3902999/Lifestyles-in-transition-evolution-and-natural

- 22 MARCO, M. L., D. HEENEY, S. BINDA, et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017, **44**, 94–102. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.11.010. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095816691630266X>
- 23 FAO/WHO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London Ontario (Canada), 2002.
- 24 BULL, M., S. PLUMMER, J. MARCHESI a E. MAHENTHIRALINGAM. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiology Letters*. 2013, **349**(2), 77–87. DOI: 10.1111/1574-6968.12293. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/1574-6968.12293>
- 25 *Lactobacillus*. *Hardy Diagnostics* [online]. Santa Maria (California): Hardy Diagnostics, c2019 [cit. 2019-01-28]. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Lactobacillus.htm
- 26 MURTEY, M. D. a P. RAMASAMY. Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*. London: InTech, 2016, 2016-02-18, s. 161–185. DOI: 10.5772/61720. ISBN 978-953-51-2252-4. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/modern-electron-microscopy-in-physical-and-life-sciences/sample-preparations-for-scanning-electron-microscopy-life-sciences>
- 27 CORRY, J. E. L., G. D. W. CURTIS, R. M. BAIRD. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. Elsevier, 2003, **37**, 511–513. Progress in Industrial Microbiology. DOI: 10.1016/S0079-6352(03)80066-8. ISBN 9780444510846. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079635203800668>
- 28 BRIGGS, M. The Classification of Lactobacilli by means of Physiological Tests. *Journal of General Microbiology*. 1953, **9**(2), 234–248. DOI: 10.1099/00221287-9-2-234. ISSN 0022-1287. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-9-2-234>
- 29 KANG, T. S., D. R. KORBER a T. TANAKA. Regulation of Dual Glycolytic Pathways for Fructose Metabolism in Heterofermentative *Lactobacillus panis* PM1. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, **79**(24), 7818–7826. DOI: 10.1128/AEM.02377-13. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02377-13>
- 30 ZHAO, X. a M. G. GÄNZLE. Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*. 2018, **272**, 12–21. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518300722>

- 31 POKUSAEVA, K., G. F. FITZGERALD a D. VAN SINDEREN. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition*. 2011, **6**(3), 285–306. DOI: 10.1007/s12263-010-0206-6. ISSN 1555-8932. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12263-010-0206-6>
- 32 Bifidobacterium. *Hardy Diagnostics* [online]. Santa Maria (California): Hardy Diagnostics, c2019 [cit. 2019-02-02]. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Bifidobacterium.htm
- 33 THONGARAM, T., J. L. HOEFLINGER, J. CHOW a M. J. MILLER. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *Journal of Dairy Science*. 2017, **100**(10), 7825–7833. DOI: 10.3168/jds.2017-12753. ISSN 00220302. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217307300>
- 34 FUSHINOBU, S. Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, **74**(12), 2374–2384. DOI: 10.1271/bbb.100494. ISSN 0916-8451. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.100494>
- 35 CALINOIU, L. F., D. VODNAR a G. PRECUP. A Review: The Probiotic Bacteria Viability under Different Conditions. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*. 2016, **73**(2), 55–60. DOI: 10.15835/buasvmcn-fst:12448. ISSN 2344-5300. Dostupné také z: <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/fst/article/view/12448>
- 36 AMUND, O. D. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 2016, **62**(9), 715–725. DOI: 10.1139/cjm-2016-0186. ISSN 0008-4166. Dostupné také z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2016-0186>
- 37 AMMOR, M. S., A. BELÉN FLÓREZ a B. MAYO. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*. 2007, **24**(6), 559–570. DOI: 10.1016/j.fm.2006.11.001. ISSN 07400020. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006002103>
- 38 PITTET, V., K. MORROW a B. ZIOLA. Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria, Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene Gtf. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018, **69**(1), 57–61. DOI: 10.1094/ASBCJ-2011-0124-01. ISSN 0361-0470. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1094/ASBCJ-2011-0124-01>
- 39 CREMON, C., M. R. BARBARO, M. VENTURA a G. BARBARA. Pre- and probiotic overview. *Current Opinion in Pharmacology*. 2018, **43**, 87–92. DOI: 10.1016/j.coph.2018.08.010. ISSN 14714892. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489218300833>

- 40 MUSILOVÁ, Š. a V. RADA. Vliv oligosacharidů mateřského mléka na střevní mikrobiotu kojenců. *Pediatric pro praxi*. 2015, **16**(1), 17–19.
- 41 SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J. M. SCHMITTER a P. BRESSOLLIER. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT – Food Science and Technology*. 2013, **50**(1), 1–16. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002319>
- 42 FRIČ, P. Problémy probiotické terapie. *Interní medicína pro praxi*. 2008, **10**(7 a 8), 345–347.
- 43 BARTH, R. *The chemistry of beer: the science in the suds*. Hoboken: Wiley, c2013. ISBN 978-1-118-67497-0.
- 44 Pivo. *Naše řeč*. 1936, **20**(1), 23.
- 45 Spotřeba alkoholických nápojů na 1 obyvatele v České republice. *Český statistický úřad* [online]. 2019 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: https://www.czso.cz/csu/czso/cr_od_roku_1989_alkohol
- 46 ČESKO. Vyhláška č. 248/2018 Sb. ze dne 24. října 2018, Vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: *Sbírka zákonů* 31. 10. 2018, roč. 2018, částka 125. ISSN 1211-1244.
- 47 BASAŘOVÁ, G. a I. HLAVÁČEK. *České pivo*. 2. vyd. Praha: Nuga, 1999. ISBN 80-859-0308-3.
- 48 KOSAŘ, K. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 80-902-6586-3.
- 49 KADLEC, P., K. MELZUCH a M. VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- 50 DRDÁK, M. *Základy potravinářských technologií: spracovania rastlinných a živočišných surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- 51 VERHOEF, B. *Encyklopedie piva*. 2. vyd. Čestlice: Rebo Productions, 1999. ISBN 80-723-4116-2.
- 52 CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.
- 53 Finest Lager Malt. *Simpsons Malt: The home of good malt* [online]. Berwick-Upon-Tweed: Simpsons Malt, c2019 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.simpsonsmalt.co.uk/our-malts/finest-lager-malt/>
- 54 Black Malt. *Simpsons Malt: The home of good malt* [online]. Berwick-Upon-Tweed: Simpsons Malt, c2019 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.simpsonsmalt.co.uk/our-malts/black-malt/>

- 55 A guide to fresh hops, fresh hop beers, and fresh hop season. *Inland Wharf Brewing Co.* [online]. Murrieta: Inland Wharf Brewing, c2018 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://inlandwharfbrewing.com/a-guide-to-fresh-hops-fresh-hop-beers-and-fresh-hop-season/>
- 56 TAFER, H., K. STERFLINGER a K. LOPANDIC. Draft Genome Sequence of the Interspecies Hybrid *Saccharomyces pastorianus* Strain HA2560, Isolated from a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Genome Announcements*. 2018, **6**(17), e00341–18. DOI: 10.1128/genomeA.00341-18. ISSN 2169-8287. Dostupné také z: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.00341-18>
- 57 WENDLAND, J. Lager Yeast Comes of Age. *Eukaryotic Cell*. 2014, **13**(10), 1256–1265. DOI: 10.1128/EC.00134-14. ISSN 1535-9778. Dostupné také z: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.00134-14>
- 58 BISHOP, L. R. European Brewery Convention The E.B.C. Scale of Bitterness. *Journal of the Institute of Brewing*. 1967, **73**(6), 525–527. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1967.tb03078.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1967.tb03078.x>
- 59 PREEDY, V. R. *Beer in Health and Disease Prevention*. London: Academic Press, 2011. ISBN 978-0-12-373891-2.
- 60 Galerie pivních stylů: Soury čili kyseláče. *Debaras* [online]. Praha: D&R Solution, 2019 [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <http://www.debaras.cz/gastroscena/aktuality-v-gastronomii/galerie-pivnich-stylu-soury-cili-kyselace>
- 61 MCFARLAND, J. The Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1907, **XLIX**(14), 1176–1178. DOI: 10.1001/jama.1907.25320140022001f. ISSN 0098-7484. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- 62 ANJUM, N., S. MAQSOOD, T. MASUD, A. AHMAD, A. SOHAIL a A. MOMIN. *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014, **54**(9), 1241–1251. DOI: 10.1080/10408398.2011.621169. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.621169>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABC	ABC přenašeč (<i>ATP-binding cassette transporter</i>)
ATP	adenosintrifosfát
B	Birell (reálný vzorek piva)
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
B10	Bernard Desítka (reálný vzorek piva)
B12	Bernard Dvanáctka (reálný vzorek piva)
<i>Bc.</i>	<i>Bacillus</i>
BI	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
BR	<i>Bifidobacterium breve</i>
BN	Bernard s čistou hlavou Free (reálný vzorek piva)
CD	Crohnova choroba (<i>Crohn's disease</i>)
CFU	kolonie tvořící jednotku (<i>colony forming unit</i>)
DMS	dimethylsulfid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
EBC	Evropská pivovarská konvence (<i>European Brewery Convention</i>)
EBU	evropská jednotka hořkosti (<i>European Bitterness Unit</i>)
EC	označení klasifikačního systému enzymů (<i>Enzyme Commission</i>)
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (<i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	(<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPM	extrakt původní mladiny
FAO	Organizace Spojených národů pro výživu a zemědělství (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FC	průtoková cytometrie (<i>flow cytometry</i>)
G+	grampozitivní
G–	gramnegativní
GALT	slizniční imunitní systém trávicí soustavy (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GIT	gastrointestinální trakt
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IBD	idiopatické střední záněty (<i>inflammatory bowel disease</i>)
IBS	syndrom dráždivého tračníku (<i>irritable bowel syndrome</i>)
IBU	mezinárodní jednotka hořkosti (<i>International Bitterness Unit</i>)
IEC	buňky střevního epitelu (<i>intestinal epithelial cells</i>)
IL	vzorek s dvousložkovou směsí probiotik: <i>Bifidobacterium bifidum</i> a <i>Lactobacillus acidophilus</i>
IL-8	interleukin 8
IR	vzorek s dvousložkovou směsí probiotik: <i>Bifidobacterium bifidum</i> a <i>Bifidobacterium breve</i>

IRL	vzorek s tříslložkovou směsí probiotik: <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> a <i>Lactobacillus acidophilus</i>
IPA	India Pale Ale
ISAPP	Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika (<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>)
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
MBC	minimální baktericidní koncentrace (<i>minimal bactericidal concentration</i>)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
MRS	deMan, Rogosa a Sharpe (médium)
NEC	nekrotizující enterokolitida (<i>necrotizing enterocolitis</i>)
NK	NK-buňky (<i>natural killer cells</i>)
P	Pilsner Urquel (reálný vzorek piva)
<i>Pc.</i>	<i>Pediococcus</i>
PET	polyethylentereftalát
P _i	anorganický fosfát
R	Radegast (reálný vzorek piva)
RI	refraktometrický detektor (<i>refractive index detector</i>)
RL	vzorek s dvousložkovou směsí probiotik: <i>Bifidobacterium breve</i> a <i>Lactobacillus acidophilus</i>
S10	Staropramen Smíchov (reálný vzorek piva)
S12	Staropramen Ležák (reálný vzorek piva)
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (<i>short chain fatty acids</i>)
sIgA	sekreční imunoglobulin A
SN	Staropramen Nealko (reálný vzorek piva)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
UC	ulcerózní kolitida (<i>ulcerative colitis</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)

9 SEZNAM PŘÍLOH

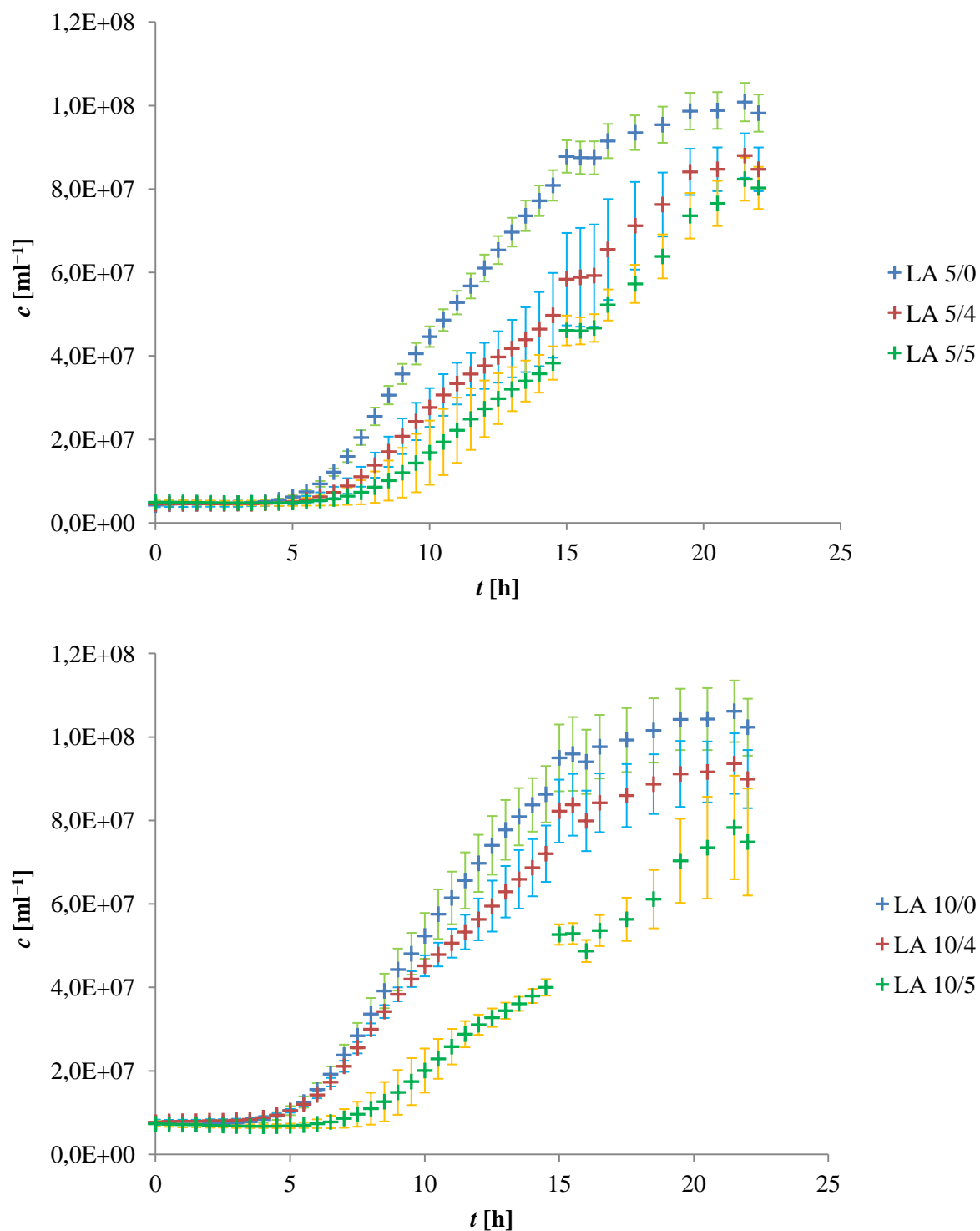
Příloha 1: Grafy růstových křivek v modelových vzorcích

Příloha 2: Grafy růstových křivek v reálných vzorcích

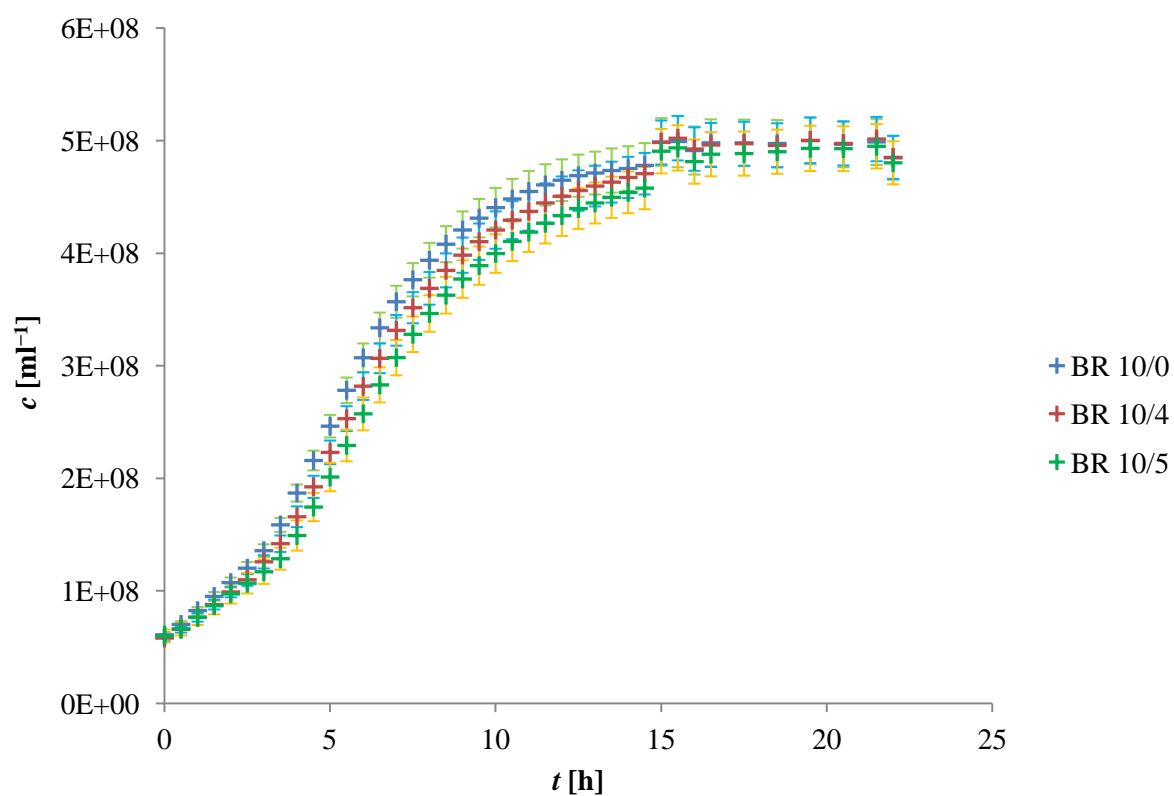
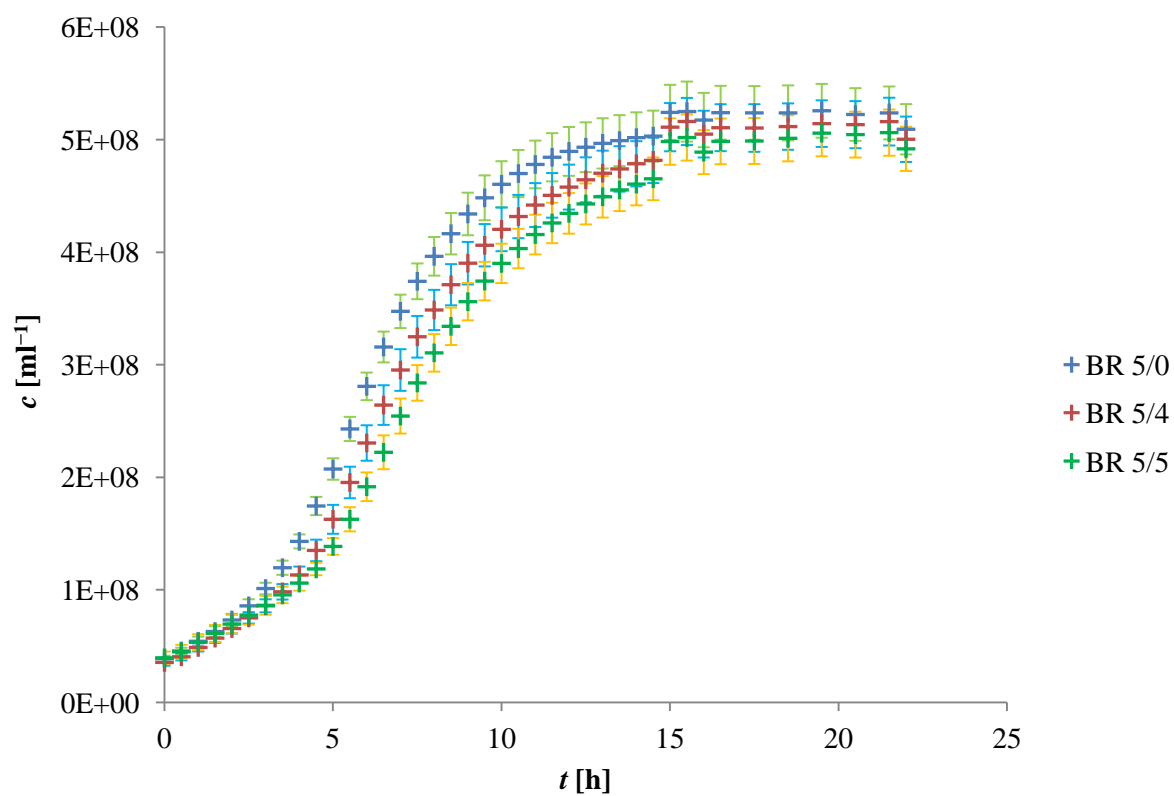
Příloha 3: Dotazník k sensorické analýze

10 PŘÍLOHY

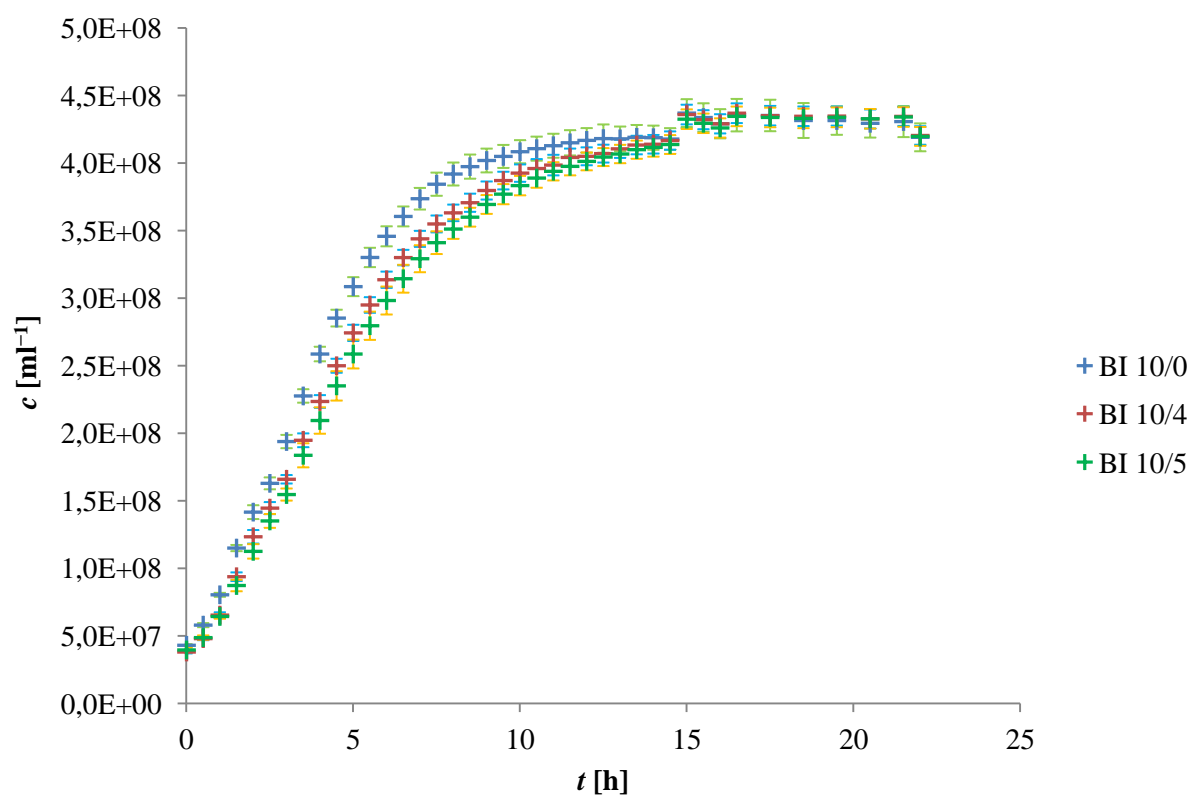
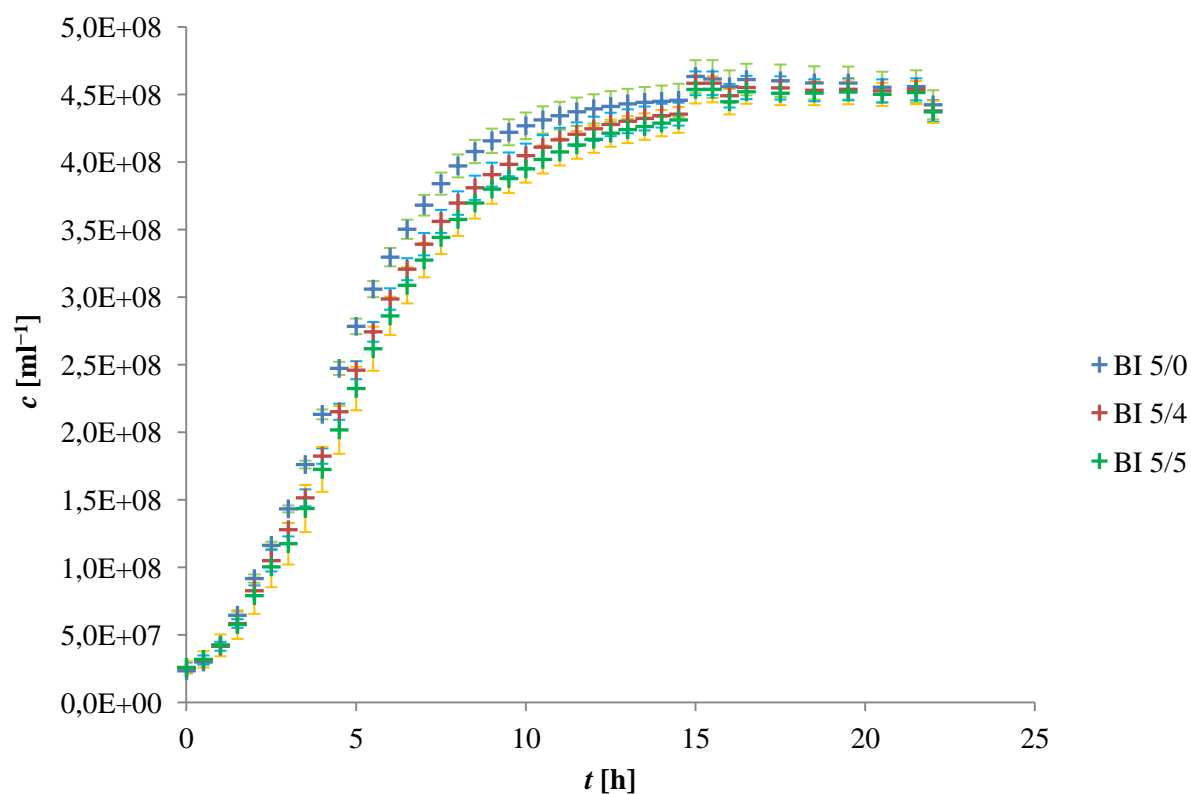
Příloha 1: Grafy růstových křivek v modelových vzorcích



Obr. 24: Růstové křivky kmene *L. acidophilus* v modelových vzorcích (1. část). V legendách značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a čísla za lomítkem koncentraci ethanolu v procentech.

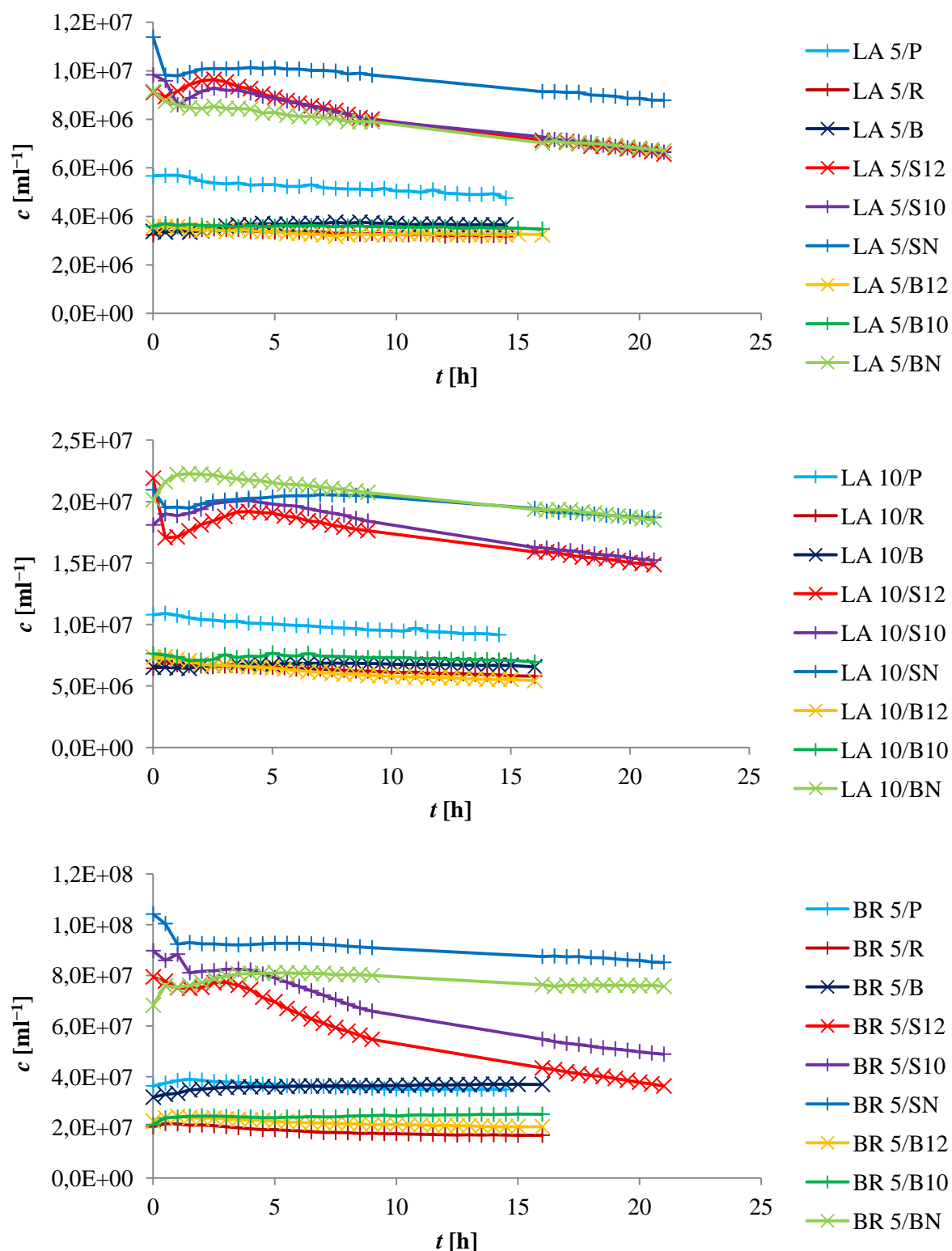


Obr. 25: Růstové křivky kmene *B. breve* v modelových vzorcích (2. část). V legendách značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a čísla za lomítkem koncentraci ethanolu v procentech.

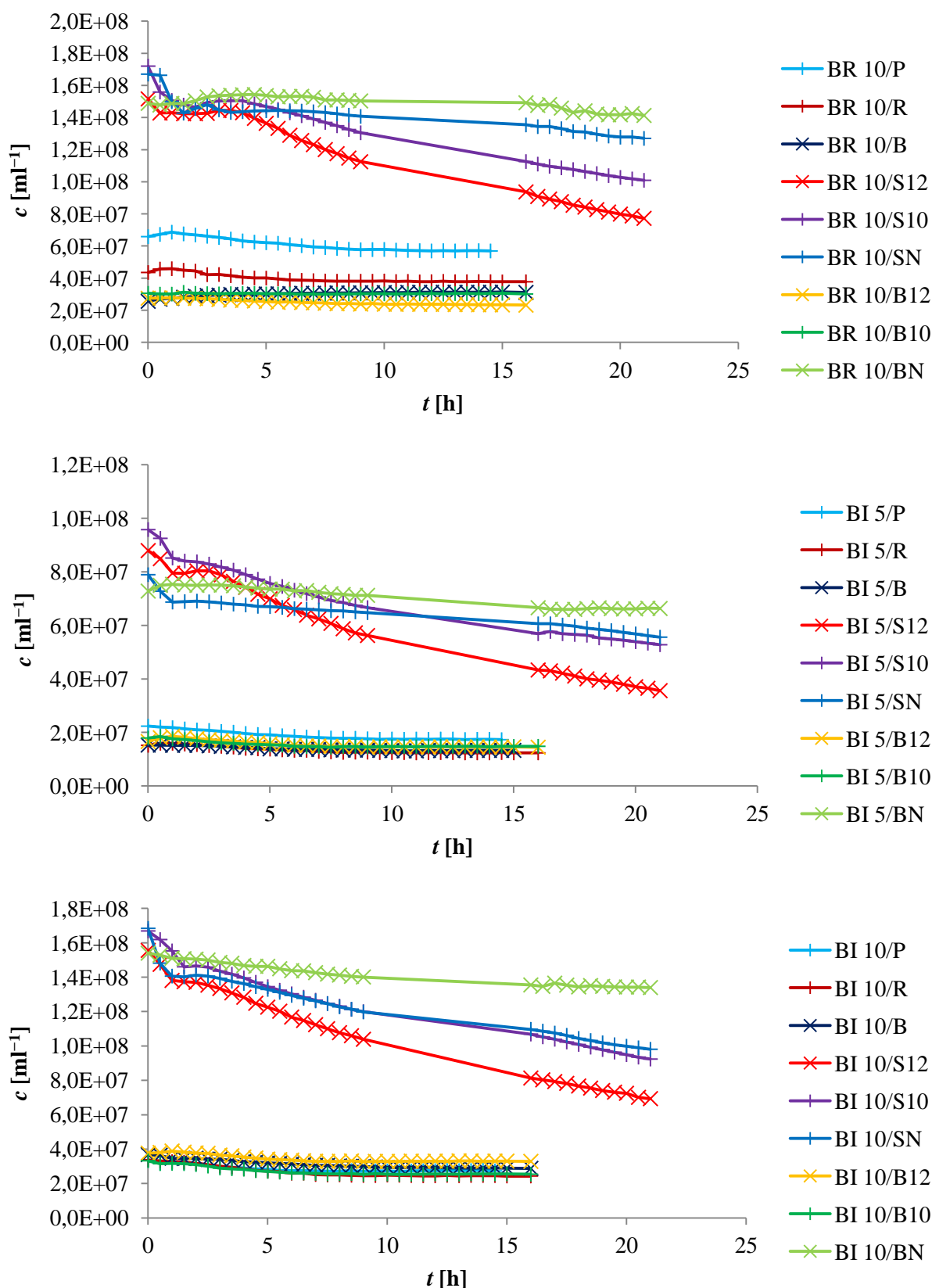


Obr. 26: Růstové křivky kmene *B. bifidum* v modelových vzorcích (3. část). V legendách značí čísla před lomítkem poměr inokulace v procentech a čísla za lomítkem koncentraci ethanolu v procentech.

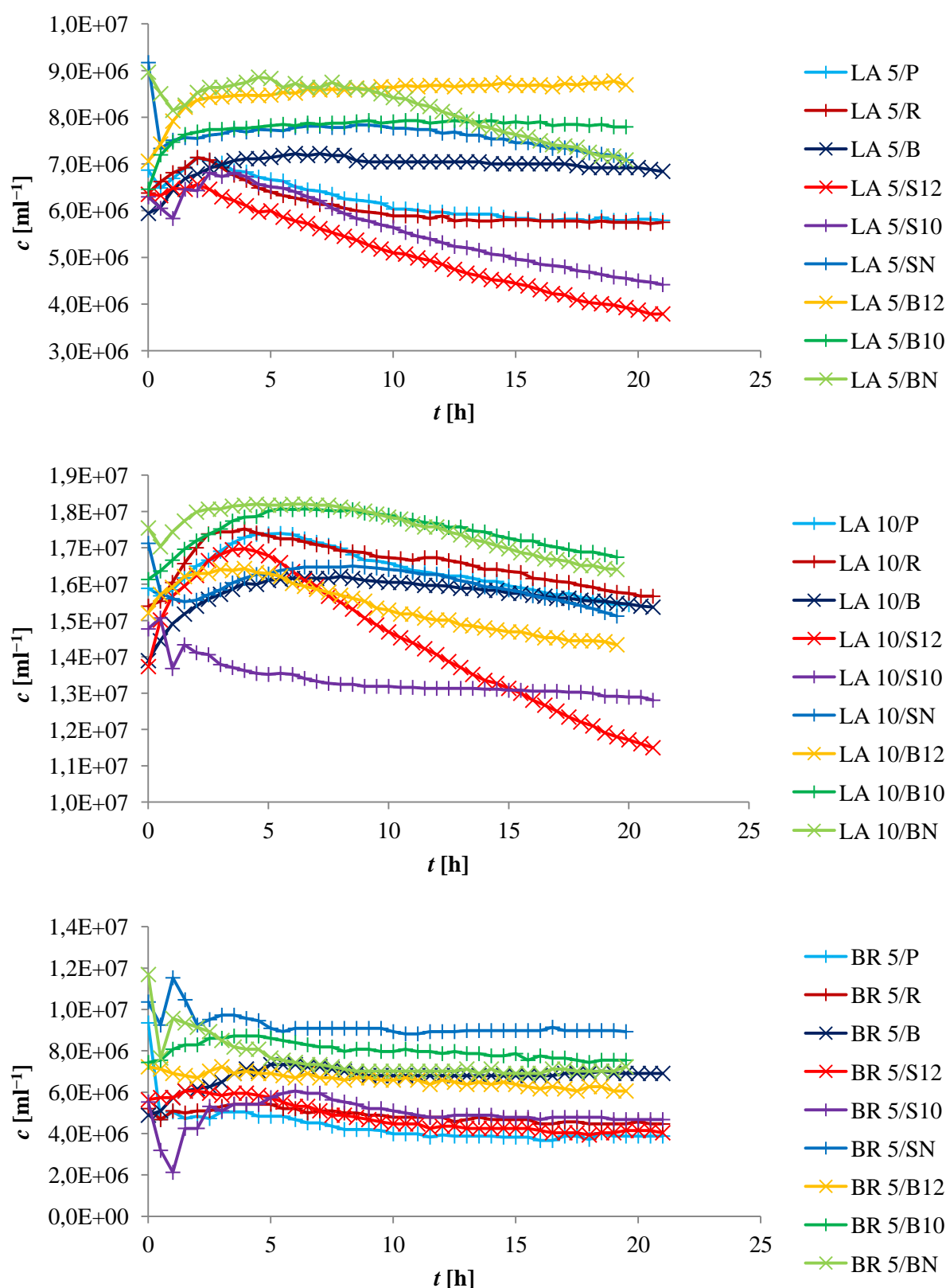
Příloha 2: Grafy růstových křivek v reálných vzorcích



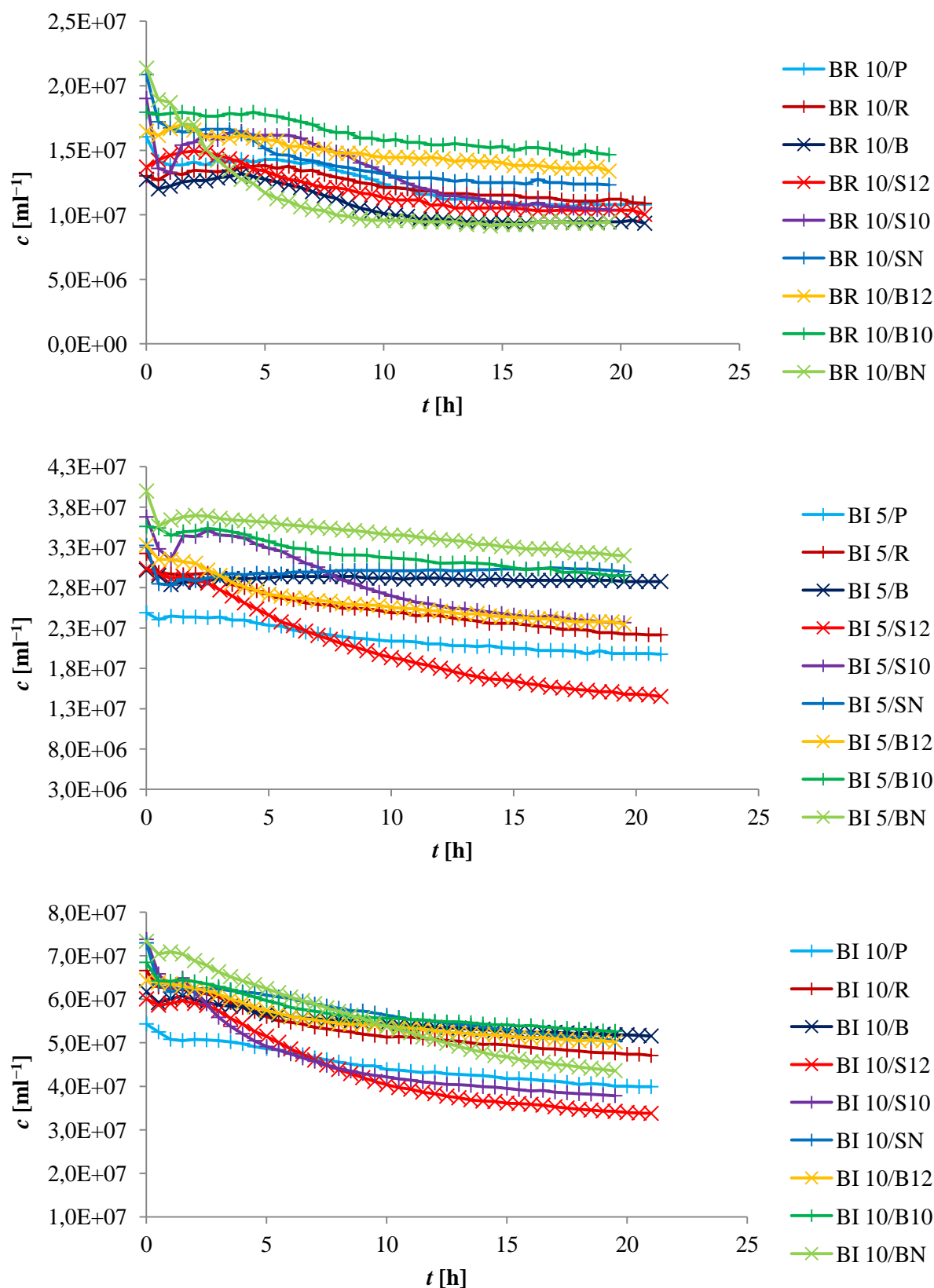
Obr. 27: Růstové křivky probiotik v reálných vzorcích pív (inokulace ve stacionární fázi, 1. část). V legendách ke grafům značí první dvoupísmenná zkratka použitý kmen, tj. LA pro *L. acidophilus*, BR pro *B. breve* a BI pro *B. bifidum*. Následuje číslo před lomítkem, udávající poměr inokulace v procentech, a zkratka za lomítkem pro reálný vzorek piva. Zkratky reálných vzorků pív viz v Tab. 8.



Obr. 28: Růstové křivky probiotik v reálných vzorcích pív (inokulace ve stacionární fázi, 2. část).
V legendách ke grafům značí první dvoupísmenná zkratka použitý kmen, tj. LA pro *L. acidophilus*, BR pro *B. breve* a BI pro *B. bifidum*. Následuje číslo před lomítkem, udávající poměr inokulace v procentech, a zkratka za lomítkem pro reálný vzorek piva. Zkratky reálných vzorků pív viz v Tab. 8.



Obr. 29: Růstové křivky probiotik v reálných vzorcích piva (inokulace v exponenciální fázi, 1. část). V legendách ke grafům značí první dvoupísmenná zkratka použitý kmen, tj. LA pro *L. acidophilus*, BR pro *B. breve* a BI pro *B. bifidum*. Následuje číslo před lomítkem, udávající poměr inokulace v procentech, a zkratka za lomítkem pro reálný vzorek piva. Zkratky reálných vzorků piva viz v Tab. 8.



Obr. 30: Růstové křivky probiotik v reálných vzorcích pív (inokulace v exponenciální fázi, 2. část). V legendách ke grafům značí první dvoupísmenná zkratka použitý kmen, tj. LA pro *L. acidophilus*, BR pro *B. breve* a BI pro *B. bifidum*. Následuje číslo před lomítkem, udávající poměr inokulace v procentech, a zkratka za lomítkem pro reálný vzorek piva. Zkratky reálných vzorků pív viz v Tab. 8.

Příloha 3: Dotazník k senzorní analýze

Dotazník pro senzorické hodnocení piva obohaceného probiotiky

Vážený hodnotitelé,

zhodnotíte, prosím, předložené vzorky **piva obohaceného probiotiky**. Jedná se o vzorky světlého, svrchně kvašeného piva typu *ale*, jehož senzorické parametry se v různých ohledech mohou lišit od parametrů piv spodně kvašených, mezi něž se řadí např. pivo plzeňského (českého) typu. Pivo obohacené probiotiky navíc obsahuje probiotické bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Při senzorické analýze vzorků se prosím zaměřte na následující parametry piva: barva, čírost, vůně, hořká, kyselá a sladká chuť, příp. uveďte jiné chutě a přípachy do příslušné tabulky.

Děkuji za Váš čas věnovaný tomuto dotazníku.

Hodnotitel: muž / žena

kuřák / nekuřák

rok narození: _____

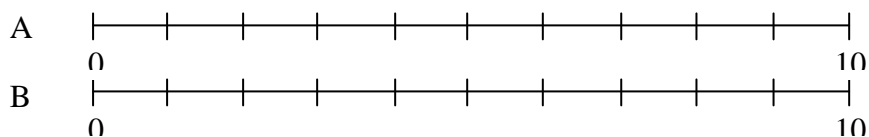
Datum:

Čas:

Senzorické hodnocení vzorků:

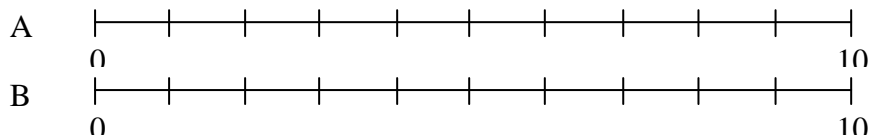
1. Barva

Barvu piva ovlivňuje zejména obsah melanoidinových látek a produktů karamelizačních reakcí. Podle typu piva se barva může pohybovat od zlatožluté, přes zlatohnědou až k tmavohnědé. Na níže uvedených osách prosím vyznačte intenzitu barvy piva u předložených vzorků A a B (0 – bez barvy, 10 – velmi intenzivní zbarvení).



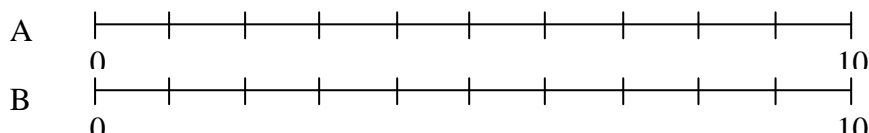
2. Čiřrost

Čiřrost (průzračnost) piva je významným znakem. Pivo může obsahovat zákal či sedlinu. Na níže uvedených osách prosím vyznačte čiřrost piva u předložených vzorků A a B (0 – čiřé, 10 – zakalené).



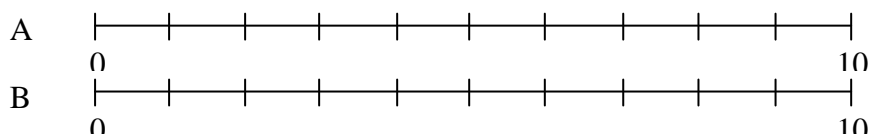
3. Vůně

Vůně je komplexní vlastností, která rozhoduje o prvním dojmu a velmi ovlivňuje celkový senzorický vjem při požití piva. Na níže uvedených osách prosím vyznačte kvalitu vůně piva u předložených vzorků A a B (0 – nevyhovující, 10 – vynikající).



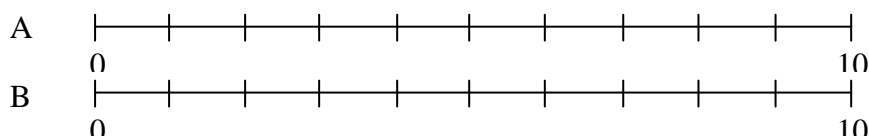
4. Hořká chuť

Hořkost je jedna z hlavních vlastností piva. Je dána především obsahem α -hořkých kyselin, pocházejících z chmelu. Na níže uvedených osách prosím vyznačte intenzitu hořkosti piva u předložených vzorků A a B (0 – neznatelná hořkost, 10 – velmi intenzivní hořkost).



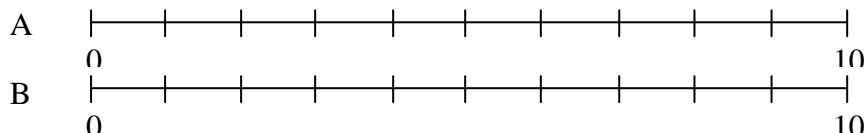
5. Kyselá chuť

Kyselá chuť piva bývá způsobena zvýšeným obsahem kyseliny octové či mléčné. Na níže uvedených osách prosím vyznačte intenzitu kyselosti piva u předložených vzorků A a B (0 – neznatelná kyselost, 10 – velmi intenzivní kyselost).



6. Sladká chuť

Sladká chuť piva může být zapříčiněna např. zvýšeným obsahem neprokvašených sacharidů či obsahem peptidů. Na níže uvedených osách prosím vyznačte intenzitu sladkosti piva u předložených vzorků A a B (0 – neznatelná sladkost, 10 – velmi intenzivní sladkost).



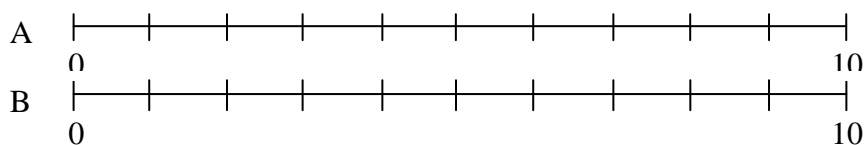
7. Další (cizí) chutě a přípachy

Celková chuť piva může být ovlivněna přítomností méně příjemných či vyloženě nepříjemných cizích chutí a přípachů. Do následující tabulky prosím uveďte, jaké chutě a přípachy jsou v jednotlivých vzorcích piva přítomny a jaká je jejich intenzita od 0 do 10 (0 – neznatelné, 10 – velmi intenzivní).

vzorek A cizí chuť/přípach	intenzita	vzorek B cizí chuť/přípach	intenzita

8. Celková podobnost vzorků pivu

Na níže uvedených osách prosím vyznačte, do jaké míry jsou podle Vašeho mínění analyzované vzorky A a B podobné klasickému svrchně kvašenému pivu typu *ale* (0 – vzorky jsou sensoricky naprosto odlišné od klasického svrchně kvašeného piva, 10 – vzorky sensoricky odpovídají klasickému svrchně kvašenému pivu).



9. Celkové hodnocení vzorků

Na níže uvedených osách prosím uveďte vlastní celkové hodnocení přijatelnosti analyzovaných vzorků A a B (0 – nepřijatelné, 10 – vynikající).

